Aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lorenz
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

UNTERSUCHUNGEN ZUR pH-ABHÄNGIGKEIT DER HEMMUNG VON PEPTISCHER AKTIVITÄT DURCH CHONDROITINSULFAT IM HINBLICK AUF DIE ENTSTEHUNG VON PEPTISCHEN ULCERA IM MAGEN-DARM-KANAL UND DEREN THERAPIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

HEINZ WESSMANN
aus Baccum/Lingen

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lorenz
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

UNTERSUCHUNGEN ZUR pH-ABHÄNGIGKEIT DER HEMMUNG VON PEPTISCHER AKTIVITÄT DURCH CHONDROITINSULFAT IM HINBLICK AUF DIE ENTSTEHUNG VON PEPTISCHEN ULCERA IM MAGEN-DARM-KANAL UND DEREN THERAPIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

HEINZ WESSMANN

aus Baccum/Lingen

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 22. September 1978
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. W. Lorenz
Correferent: Prof. Dr. med. D. Maroske

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Einführung in die Problematik der Bestimmung von peptischer Aktivität im Magensaft	1
2.	HISTORISCHE ENTWICKLUNG	2
2.1.	Geschichtliche Entwicklung der Untersuchungen über die Magensaft-zusammensetzung	2
2.2.	Geschichte der Hemmstoffe der peptischen Aktivität	5
3.	THEORIEN ZUR ENTSTEHUNG VON ULCERA IN MAGEN UND DUODENUM	7
3.1.	Ätiologie des Ulcus ventriculi	8
3.2.	Ätiologie des Ulcus duodeni	9
4.	BIOCHEMIE VON PEPSINOGEN UND PEPSIN	11
4.1.	Pepsinbestimmungsmethoden	13
4.2.	pH-Aktivitätskurven des Pepsins	15
4.2.1.	Einflüsse auf die Form der pH-abhängigen Pepsinaktivitätskurven	20
5.	EINTEILUNG UND BIOCHEMIE DER MUCOSUBSTANZEN	23
5.1.	Struktureller Aufbau des Chondroitin-sulfates (Ch-6-S)	27
5.2.	Struktureller Aufbau von Carrageenan	30

Seite

6. WIRKUNG DER SULFATIERTEN POLYSACCHARIDEN AUF DIE PEPTISCHE AKTIVITÄT 32

6.1. Inhibierung der peptischen Aktivität 32

6.2. Stimulierung der peptischen Aktivität 35

6.3. Nebenwirkung der Pepsininhibitoren 36

6.4. Mechanismen der antipeptischen und antiulcerativen Wirkung der sulfatierten Polysaccharide 37

6.4.1. in-vitro-Untersuchungen 37

6.4.2. in-vivo-Untersuchungen 46

7. ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN 49

7.1. Entwicklung einer einfachen Methode zur Bestimmung der Pepsinaktivität 50

7.2. Untersuchung über die optimale Bezugsgröße für den Grad der Hemmung der peptischen Aktivität 51

7.3. Untersuchung über die Hemmung der proteolytischen Aktivität durch Chondroitinsulfat 51

7.4. Untersuchung über die Eignung von Chondroitinsulfat als Therapeutikum bei Ulcus ventriculi und Ulcus duodeni 52

8. MATERIAL UND METHODIK 53

8.1. Material 53

8.1.1. Reagenzien für die Bestimmung der peptischen Aktivität 53

8.1.2. Herstellung der Rinderhämoglobinlösung 53

8.1.3. Herkunft der Magensäfte 54

8.2. Methodik 55

8.2.1. Versuchsanordnung 55

		Seite
9.	ERGEBNISSE	57
9.1.	Pepsin-Aktivitätskurve in Abhängigkeit vom pH, ohne Zusatz von Chondroitinsulfat	57
9.2.	Untersuchung über die Wirkung von unterschiedlichen Chondroitinsulfat-Konzentrationen (Ch·S) auf die peptische Aktivität (Tab. 1/Abb. 13)	59
9.3.	Untersuchung über die Wirkung von Chondroitinsulfat auf die peptische Aktivität bei unterschiedlichen Krankheitsbildern (Tab.2/Abb.14)	62
10.	DISKUSSION	65
10.1.	Schwierigkeiten bei der quant. Bestimmung peptischer Aktivität	65
10.1.1.	Herkunft des Pepsins	66
10.1.2.	Art und Konzentration des Substrates	66
10.1.2.1.	Art des Substrates	66
10.1.2.2.	Konzentration des Substrates	67
10.1.3.	Salzkonzentration der Lösung	69
10.1.4.	Art des Hemmstoffes und dessen Einfluß auf die Bestimmung der peptischen Aktivität	69
10.1.5.	Meßmethodik	71
10.1.5.1.	Extinktionsmessung	71
10.1.5.2.	TCA-Einfluß	71
10.1.5.3.	Temperatureinfluß	72
10.1.5.4.	Linearität der Umsetzgeschwindigkeit	72
10.2.	Form der Pepsinaktivitätskurve in Abhängigkeit vom pH	74
10.3.	Einfluß des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität	75
10.3.1.	Stimulierung der peptischen Aktivität	78

Seite

10.4. Unterschiede des Einflusses von Chondroitinsulfat auf die peptische Aktivität bei Ulcus-duodeni-Patienten und Ulcus-ventriculi-Patienten 80

11. ZUSAMMENFASSUNG 83

12. LITERATUR 85

1. EINLEITUNG

1.1. Einführung in die Problematik der Bestimmung von peptischer Aktivität im Magensaft

Trotz aller Fortschritte in der medizinischen Forschung existiert bis heute noch keine befriedigende Erklärung für die Entstehung der Ulcuskrankheit im Magen und im Duodenum. Auch die inhibitorische Wirkung der sulfatierten Mucopolysaccharide auf die Enzyme des Magensaftes und die damit erreichbare Ulcusheilung ist nicht hinreichend geklärt. Das hängt unter anderem damit zusammen, daß es für das Pepsin keine einfach durchzuführende, d. h. routinemäßig anwendbare Methode zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität gibt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Wirkung Chondroitinsulfat, ein sulfatiertes Polysaccharid, auf die peptische Aktivität des Magensaftes in Abhängigkeit vom pH des umgebenden Milieus ausübt.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Magensaft (s.S. 11). Diese kann man jedoch nicht ohne weiteres unter einander vergleichen, da sie sehr unterschiedlicher Natur sind: Art des Substrats, Konzentration des Substrats, Reaktionstemperatur, Reaktionszeit, Meßmethoden u.v.a.m. sind verschieden. Es war daher notwendig, zu Beginn unserer Untersuchungen die

Probleme, die bei der quantitativen Bestimmung der peptischen Aktivität auftauchen, zusammenzustellen, um eine Methode zu entwickeln, die den Anforderungen der modernen Enzym-Chemie genügt.

2. HISTORISCHE ENTWICKLUNG

2.1. Geschichtliche Entwicklung der Untersuchungen über die Magensaftzusammensetzung

Seit einigen hundert Jahren interessierten sich Ärzte und Naturforscher für die Verdauungsvorgänge im Magen-Darm-Kanal. Es wurden zahlreiche Experimente gemacht, um den Verdauungsprozeß aufzuhellen.

BORELLI (1608 - 1679) verfütterte zum Beispiel an einen Truthahn neben Glas- und Bleikugeln auch Muscheln. Diese Stoffe wurden vom Truthahnmagen regelrecht zermahlen. VAN HELLMONT (1577 - 1644) entwickelte für die Vorgänge bei der Verdauung seine "Gärungstheorie". Danach sollten die festen und flüssigen Nahrungsbestandteile durch ein FERMENT im sauren Medium in CHYMUS verwandelt werden. Er zeigte gleichzeitig, daß Weinessig nicht das Ferment sein konnte, da Essigsäure allein keinen Chymus bildete. HALLER (1708 - 1777) sprach von einem fäulniserregenden Prozeß bei der Verdauung.

REAUMUR (1752) fütterte eine zahme Gabelweihe mit kleinen Metallröhrchen, die mit Fleisch, Knochen, Mehl und Getreidekörnern gefüllt waren. Die Röhrchen wurden wie Gewöll erbrochen. Das Fleisch und die Knochen waren vollständig aufgelöst worden, während Mehl und Getreide sich kaum verändert hatten. Statt der Nahrungsmittel steckte er später kleine Schwämme in die Röhrchen und gelangte auf diese Weise zu Magensaft, mit dem er Fleisch in vitro auflösen konnte. Er beobachtete auch, daß erbrochener Magensaft gegenüber Lackmus sauer reagierte.

SPALLANZANI (1783) machte erste Beobachtungen über die Verdauungsaktivität von menschlichem Magensaft. Er schluckte kleine Leinensäckchen, die gekautes Brot und andere Substanzen enthielten, und zog sie mit Hilfe von Bindfäden nach 24 Stunden wieder heraus. Es stellte sich heraus, daß das Brot teilweise oder ganz verschwunden war.

STEVENS (1777) machte ungefähr zur gleichen Zeit ähnliche Versuche und kam zu adäquaten Ergebnissen.

WILLIAM PROUT (1785 - 1850) identifizierte die im Magensaft vorhandene Säure als HCl.

WILLIAM BEAUMONT, ein amerikanischer Militärarzt, hat zwischen 1822 und 1833 die Verdauungsphysiologie des Magens an der traumatischen Magenfistel eines kanadischen Jägers studiert. Er bestätigte das Vorkommen von HCl im Magensaft, zeigte aber, daß die Säure allein nicht für die Auflösung der Nahrungsmittel verantwortlich sein konnte. Er beobachtete zum ersten Mal, daß schon allein die Aufnahme von flüssigen oder festen Nahrungsmitteln die Sekretion des Magensaftes stimulierte.

TH. SCHWANN nannte 1836 das "eiweißverdauende Prinzip" des Magenschleimes PEPSIN.
R. HEIDENHAIN konnte (1870) anhand histologischer Untersuchungen beweisen, daß die Produktion des Pepsins in den Hauptzellen, die der Salzsäure in den Belegzellen stattfindet.
WASSMANN (1839), PEKELHARING (1896), FENGER, ADREW und RALSTON (1928) versuchten, Pepsin aus Magensaft zu isolieren.

SOERENSEN lieferte um die Jahrhundertwende die ersten pH-AKTIVITÄTSKURVEN des Pepsins. NORTHROP gelang schließlich 1930 die Herstellung von kristallisiertem Pepsin aus Magensaft und Magenmucosa des Schweines. Zirka fünfzig Jahre vorher, im Jahre 1882, hatte bereits LANGLEY das PEPSINOGEN, die Vorstufe des Pepsins entdeckt. HERRIOT und NORTHROP stellten 1936 kristallisiertes Pepsinogen aus Magenmucosa her.

Nachdem nun das Wesen der Verdauung bekannt war, fragte man sich natürlich, warum der Magen sich nicht selbst verdaute. Es lag nahe, die Ätiologie der Ulcuserkrankung mit der verdauenden Wirkung des Magensaftes in Zusammenhang zu bringen. MATZNER und WINDNER (1937), SCHIFFRIN (1940) und SCHIFFRIN und WARREN (1942) zeigten, daß HCl allein nicht der ulcerogene Faktor war, sondern daß vielmehr, wie auch schon durch WILLIAM BEAUMONT bei der Verdauung von Nahrungsmitteln gezeigt, Pepsin in Gegenwart von HCl bei einem pH von 1,1 - 1,5 Läsionen der Magenmucosa bewirkte.

2.2. Geschichte der Hemmstoffe der peptischen Aktivität

Untersuchungen zur Hemmung der peptischen Aktivität des Magensaftes wurden erstmals in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts gemacht. Damals fand man, daß saure Mucopolysaccharide eine Schutzwirkung auf die Mucosa des Magens ausüben. 1932 berichteten BABKIN und KOMAROV, daß "Mucoitin- und Schwefelsäurekomponenten" im Magenschleim des Hundes faßbar seien, die die proteolytische Aktivität des Magensaftes ohne Veränderung des Spiegels an freier Acidität verringerten. 1953 fanden SMITH und GALLOP, daß die "Mucoitin- und Schwefelsäurekomponenten" des Magenschleimes aus einer Mischung von Chondroitinsulfat und Heparin bestanden. 1954 demonstrierten LEVEY und SHEINFELD, daß die proteolytische Wirkung von Pepsin auf Casein durch folgende sulfatierte Polysaccharide inhibiert werden konnte: Heparin, Polyhydromannuronsäuresulfat und Chondroitinsulfat.

Auf der Suche nach ähnlichen in der Natur vorkommenden Stoffen stieß man unter anderen auf abgebautes Carrageenan, welches aus Seetangextrakt gewonnen wurde. ANDERSON und WATT entdeckten 1959 die protektive Wirkung von Carrageenan und chemisch abgebautem Carrageenan gegenüber histamininduzierten Ulcera bei Meerschweinchen. Die inhibitorische Wirkung des Carrageenans wurde von weiteren Autoren untersucht (HOUCK, LEE, BAAYANA 1959, PIPER und FENTON 1961, ANDERSON 1962, 1963, BONFILS et al. 1959, 1960, 1966, 1968).

Die praktische Anwendung sulfatierter Polysaccharide, speziell des Carragenans, in der Therapie seit Beginn der sechziger Jahre, insbesondere in Frankreich, Spanien, England, Italien und der Schweiz unter dem Namen EBIMAR hat ergeben, daß die durch dieses sulfatierte Polysaccharid hervorgerufene Hemmung der peptischen Aktivität tatsächlich auf die Heilung der Ulcuskrankheit einen Einfluß ausübt.

3. THEORIEN ZUR ENTSTEHUNG VON ULCERA IN MAGEN UND DUODENUM

Es wurden bis zum heutigen Zeitpunkt viele verschiedene Ulcusentstehungstheorien aufgestellt. Doch ist weder die Ulcusentstehung noch der Mechanismus der Ulcusverhütung bzw. -heilung durch bestimmte Substanzen bis heute befriedigend geklärt.

Die Pathogenese der Ulcuskrankheit ist nicht einheitlich, wie früher angenommen wurde (VIRCHOW 1853, KONJETZNY 1920), sondern kann nur aus dem Zusammentreffen verschiedener Faktoren erklärt werden (GAMBLE 1961, SHAY und DAVID 1963). Die wichtigsten Faktoren bei der Entstehung peptischer Ulcera bestehen nach den derzeit gültigen Vorstellungen in:

a) Verlust der protektiven Wirkung des Magenschleimes
b) direkte Schleimhautepithelschädigung
c) lokalen Durchblutungsstörungen
d) Säureüberschuß (Ulcus duodeni)

SHAY sprach von einer Störung des Gleichgewichtes zwischen aggressiven Faktoren (HCl und Pepsin) und defensiven Faktoren (Zustand der Schleimhaut, Zusammensetzung des Magenschleimes, normale Entleerung). Dieses Gleichgewicht hängt nicht nur vom Magen ab, sondern auch von hormonalen und nervösen Abläufen. Weiter ist ein hereditärer, an die Blutgruppen gebundener Faktor für die Ulcusgenese bewiesen.

3.1. Ätiologie des Ulcus ventriculi

Abgesehen von den oben erwähnten Ulcustheorien wird für das Ulcus ventriculi folgendes diskutiert:

Eine Pylorusfunktionsstörung bewirkt einen duodenogastrischen Reflux. Dieser induziert eine chronische Gastritis, diese wiederum ein Magenulcus (OTTENJAHN 1974).

DAVENPORT hat 1972 tatsächlich nachgewiesen, daß die zu den Detergentien gehörende Gallensalze, ähnlich wie Alkohol, Salicylsäure und Acetylsalicylsäure, die lipidhaltige Plasmamembran der oberflächlichen Schleimhautepithelien, die sogenannte Mucosabarriere, lädierten und sie somit für H^+-Ionen durchlässig machten.

Gallereflux bewirkte also eine Rückdiffusion von H^+-Ionen in die Schleimhaut. Diese aber lösen ihrerseits die Freisetzung von Histamin und Gastrin in der Mucosa aus. Während die normale H^+-Ionen-Konzentrationen in der Magen-Schleimhaut nicht ausreicht, um Pepsin in größerer Menge zu aktivieren, kann ein starker Anstieg der H^+-Ionen-Konzentration in Verbindung mit der autokatalytischen Aktivierung des Pepsinogens eine signifikante Pepsinproduktion und nachfolgende Proteolyse verursachen (ANDERSON 1969, SAMLOFF 1971).

Substanzen, die also die Rückdiffusion von H^+-Ionen vermindern, sind in der Lage bei Pylorusfunktionsstörungen als Ulcustherapeutika Verwendung zu finden. Dies ist zum Beispiel nach einer Studie von CALCRAFT (1973) beim Amylopectin der Fall.

3.2. Ätiologie des Ulcus duodeni

Für das Ulcus duodeni sollten noch folgende Überlegungen berücksichtigt werden:

Man geht allgemein davon aus, daß das Ulcus duodeni die Folge einer überhöhten Acidität im Bulbus duodeni durch überschüssige HCl-Bildung im Magen ist. Dies ist sicherlich häufig anzutreffen, braucht aber nicht immer der Fall zu sein. Es muß ja nicht immer eine Hyperchlorhydrie vorliegen, sondern eine Verminderung des $NaHCO_3$-Output aus dem Pankreas kann ebenfalls das saure Milieu im Bulbus duodeni verstärken (RUNE S. J. 1973).

Magen- und Duodenalschleimhaut sind relativ resistent gegenüber Pepsin, können aber durch Trypsin sehr wohl angegriffen werden (ANDERSON R.K. und FARMER C.J. 1934, HARTIALA und GROSSMAN 1952, JANNOWITZ und HOLLANDER 1954).

Ein Zusammenbruch der Mucosabarriere des Duodenums infolge Trypsineinwirkung kann nach Meinung von HOSKINS und ZAMCHEK (1963) eine der Hauptursachen bei der Entstehung der Duodenalulcera sein. Denn diese entstehen ja immer im ersten Teil des Duodenums.

Zusammenfassend kann man auf Grund der oben beschriebenen unterschiedlichen Theorien der Ulcusentstehung im Duodenum und Magen eventuell auch in vitro eine unterschiedliche Wirkungsweise der Ulcus-Hemmstoffe erwarten.

4. BIOCHEMIE VON PEPSINOGEN UND PEPSIN

Das inaktive Pepsinogen wird in den Hauptzellen der Fundusdrüsen des Magens gebildet und als solches sezerniert (SCHWANN 1836). Pepsinogen hat ein Molekulargewicht von 42.000 und ist alkalistabil (pH 9).

Das Pepsinogen des Schweines ist stabil in neutralen und leicht alkalischen Lösungen und hat seinen isoelektrischen Punkt bei pH 3,7 (DIXON, WEBB 1967). Die Analyse der Endgruppe ergab nur eine N-terminale Aminosäure, nämlich Leucin sowie auch nur eine C-terminale Aminosäure, Alanin. Nach Reduktion der Disulfidbrücken tritt keine Änderung des Molekulargewichts ein, so daß man daraus schließen kann, daß das Molekül des Pepsinogens nur aus einer Peptidkette besteht.

Das Proferment Pepsinogen wird durch Salzsäure und Autokatalyse im Magen in das verdauungsaktive Pepsin übergeführt.

$$\text{Pepsinogen} \xrightarrow[\text{Pepsin}]{H^+Cl^-} \text{Pepsin} + \text{Pepsininhibitor}$$

Die Konversion des Enzyms beginnt langsam bei pH 6 und ist vollständig bei pH 2 (EGE 1923).

Das Pepsin, eine Endopeptidase, ist ein globuläres Protein, zu dessen Stabilisierung eher hydrophobe Seitenketten als Wasserstoffbrückenbindungen beitragen, da das Molekül gegenüber Harnstoff relativ

unempfindlich ist. Pro Molekül enthält Pepsin eine Phosphatgruppe, die für die Aktivität jedoch nicht essentiell ist. Im aktiven Zentrum spielen Carboxylgruppen, die bei pH 2 in der Regel keine Ladungen tragen, eine Rolle. Der Teil des Pepsinogens, der als Inhibitor fungiert, überlagert das aktive Zentrum. Daraus kann man schließen, daß die Inaktivität des Pepsinogens durch sterische Behinderung hervorgerufen ist.

Das Ferment Pepsin spaltet Eiweiß zunächst durch Hydrolyse in größere Peptidstücke. Bei längerer Einwirkung werden jedoch auch niedermolekulare Bruchstücke gebildet. Durch Pepsin werden etwa 30 % der Peptidbindungen gespalten. Ester- u. Amid-Bindungen werden nicht gespalten. Die weitere Aufspaltung der Proteine erfolgt dann durch die Fermente des Pankreas und Dünndarms, wie Trypsin, Chymotrypsin, Amino- und Carboxylpeptidasen. Wie alle bekannten Proteasen zeigt Pepsin eine strenge optische Spezifität. Es werden nur Peptidbindungen gespalten, die L-Konfigurationen der Aminosäuren enthalten.

4.1. Pepsinbestimmungsmethoden

Bisher sind folgende Methoden zur Bestimmung des Pepsins beschrieben worden:

1. Titration der durch Pepsin freigesetzten Carboxylgruppen (SOERENSEN 1909, WILLSTÄTTER)
2. Titration der Aminosäuregruppen nach LINDERSTRÖM, LEY, VAN SLYKE
3. Quantitative Bestimmung der vom Hämoglobin abgespaltenen tyrosin-ähnlichen Stoffe (ANSON und MIRSKY 1932)
4. Spaltung synthetischer Peptide (z. B. APDT) nach CHIANG et al. (1966)
5. Szintigraphische Messung der trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukte von RISA (Radio-Ionated-Serum-Albumin) (LOKEN et al. 1958)
6. Szintigraphische Messung von mit J^{131} markiertem Hämoglobin (TURNER et al. 1966)
7. Immunologische Methode (LAURELL et al. 1966)

Alle diese Methoden messen, wegen der Überschneidung der Isoenzyme (Pepsine), im Bereich von pH 1 bis 4 die proteolytische Gesamtaktivität des Magensaftes. Mit Hilfe dieser Methoden wurde die Pepsinaktivität bei verschiedenen pH-Werten untersucht.

Die proteolytische Aktivität des Magensaftes und des Pepsins wurde seit Beginn der dreißiger Jahre gemessen. Die klassische Arbeit von ANSON und MIRSKY (1932) nannte Hämoglobin als Substrat. In den vierziger und fünfziger Jahren wurde dieses Verfahren wiederholt modifiziert.

Eine Reihe von Autoren verwendeten andere Substrate wie Albumin, Edestin und andere Proteine, darunter auch mit Jod ^{131} radioaktiv markiertes Albumin (RISA). Eine Anzahl von Autoren haben auch synthetische Substrate verwandt. Sie hatten nämlich festgestellt, daß Pepsin unter anderem aromatische Aminosäuren bevorzugt spaltete. Deshalb synthetisierten diese Autoren aromatische Aminosäurensubstrate, die vor allem Phenylalanin und Tyrosin enthielten, bzw. deren Derivate wie Di-Jod-Tyrosin (APDT). Es stellte sich heraus, daß APDT nur für Pepsin spezifisch ist, während Gastricsin APDT nicht spaltet.

LAURELL et al. führten dann in den sechziger Jahren eine immunologische Bestimmungsmethode ein, die zwar pepsinspezifische Ergebnisse liefert, aber zeitraubend und kostspielig ist. Der große Aufwand dieser Methode macht sie für Routinezwecke wenig brauchbar.

4.2. pH-Aktivitätskurven des Pepsins

Die pH-Aktivitätskurven des Pepsins, die bisher veröffentlicht worden sind (MERTEN 1949, MASCH und HUCHTING 1955, CHRISTENSEN 1955, PIPER 1960, ANDRE et al. 1971) wurden mit verschiedenen Methoden und Substraten gemessen. Die Unterschiede in der Form der Kurven bei Messung der Aktivität von Pepsin in Abhängigkeit vom pH sind beträchtlich. Ihr Verlauf ist abhängig von der jeweiligen Meßmethode, der Herkunft des Pepsins, der Art des Substrates und dem verwendeten Puffer (PIPER und FENTON 1965). MERTEN untersuchte 1949 die pH-Aktivität von menschlichem Magensaft gegen Hämoglobin. Er fand eine pH-Aktivitätskurve mit zwei Peaks unter Verwendung eines Ammoniumsulfat-Essigsäure-Puffers (Abb. 1). MASCH und HUCHTING erreichten 1953 bei Gebrauch von anderen Puffern und Hämoglobin als Substrat stets eine eingipflige Kurve. TAYLOR, der 1959 mit Plasmaprotein als Substrat arbeitete, fand eine dreigipflige Aktivitätskurve des Pepsins (Abb. 2).

Nach HAENDLE, LORENZ und STURM (1968) liegt das pH-Optimum für die Spaltung der natürlichen Substrate des Pepsins bei pH 2, sein isoelektrischer Punkt unter pH 1. Dabei steht der hohen Säurestabilität des Pepsins seine rasche irreversible Inaktivierung im neutralen und schwach sauren Bereich beginnend bei pH 6 gegenüber.

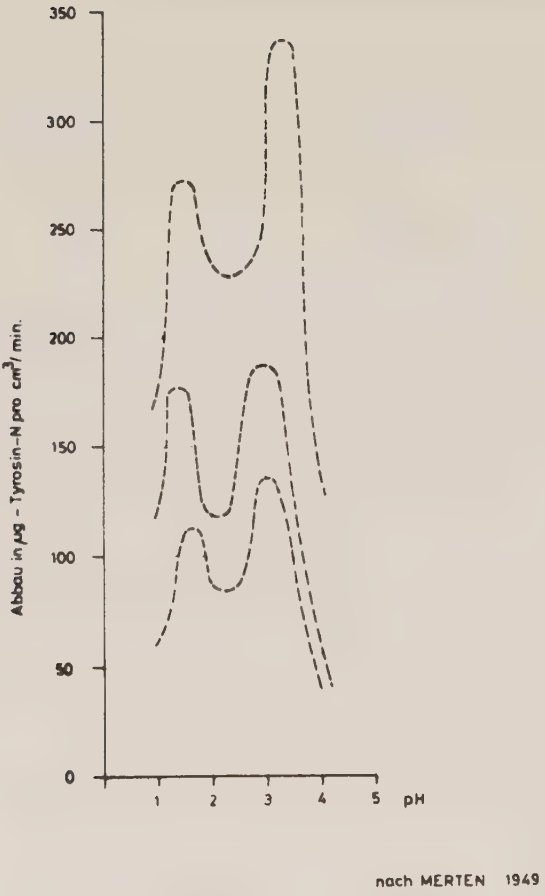


Abb. 1 pH-Aktivitätskurven von menschlichem Magensaft mit Hämoglobin als Substrat

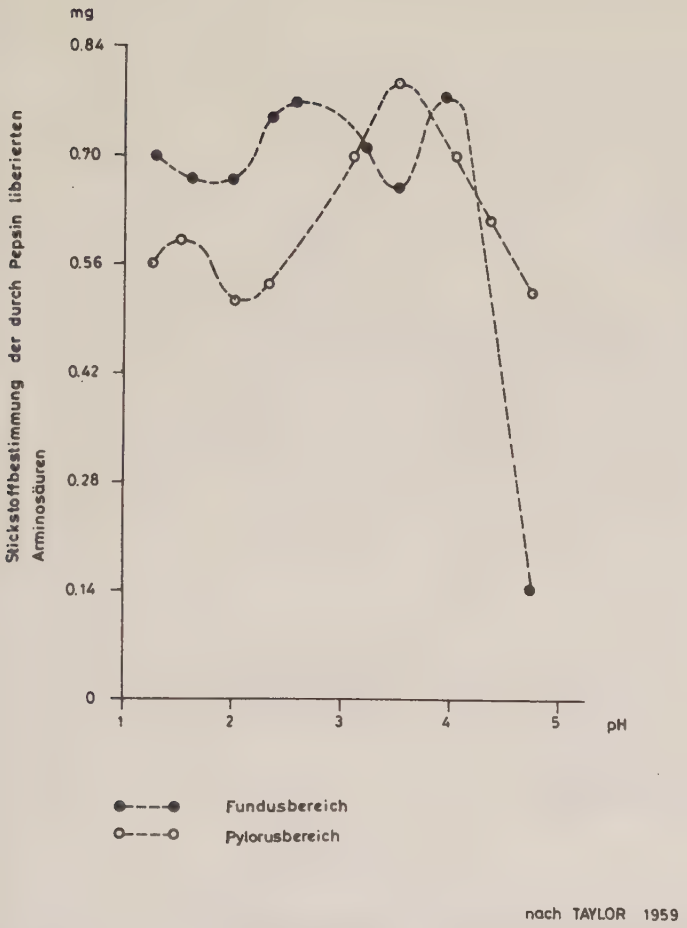


Abb. 2 pH-Aktivitätskurven von Schleimhautextrakten aus dem Fundus - und Pylorusgebiet des menschlichen Magens

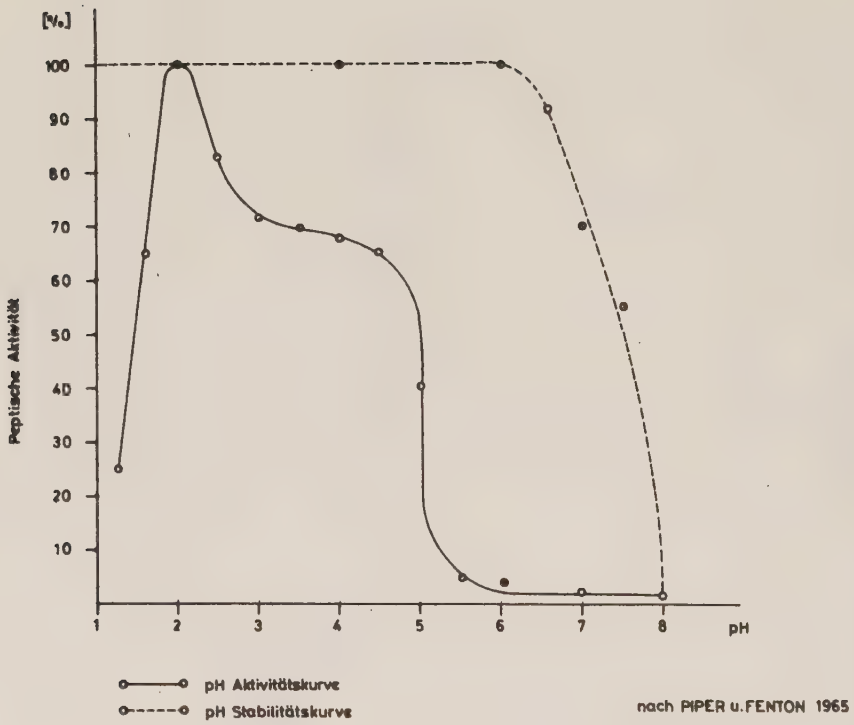


Abb. 3 pH-Aktivitätskurve und Stabilitätskurve des Pepsins
Substrat: Radio-iodinated-serum-albumin (RISA)
(nach PIPER und FENTON 1965)

Die Ergebnisse von PIPER und FENTON (1965) lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (Abb. 3):

a) pH 1,5 - 2,5 maximale pH-Aktivität
b) pH 2,5 - 5,0 annähernd 70 % der maximalen pept. Aktivität
c) pH 5,0 - 6,5 keine peptische Aktivität, Pepsin reaktivierbar
d) pH 7,5 Pepsin irreversibel inaktiviert

Die pH-Aktivitätskurve zeigt zwei Maxima bei pH 2 u. 4. Aus dem Aussehen einer pH-Aktivitätskurve allein darf man nicht, wie es schon von verschiedenen Autoren versucht worden ist, auf die ihr zugrunde liegenden Enzyme schließen. Die Begründung dafür soll auf den folgenden Seiten erläutert werden.

4.2.1. Einflüsse auf die Form der pH-abhängigen Pepsinaktivitätskurven

SCHLAMOWITZ und PETERSON (1961) sowie SEIJFFERS, MILLER u. SEGAL (1964) konnten an in Wasser gelöstem Rinderserumalbumin nachweisen, daß die Geschwindigkeit der Proteolyse bei verschiedenen Aciditäten, d. h. die Form der pH-Aktivitätskurven, direkt von der Konzentration des Substrates abhängig ist. Niedrige Konzentrationen von Rinderserumalbumin wurden in der schwächer sauren Zone bedeutend rascher verdaut als in der stark sauren. Die Kurven wurden dadurch zweigipflig, asymetrisch und im weniger sauren Gebiet spitz hochgezogen (s. Abb. 4). Bei höheren Konzentrationen des Substrates gruppierten sich die Umsätze in einer symmetrisch verlaufenden Kurve um ein einziges mittleres Optimum und wurden eingipflig!

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß zwischen pH 0,5 und pH 2 in der verdünnten Lösung gleich viel umgesetzt wird wie in der konzentrierteren, zwischen pH 2,0 und 3,5; hingegen in der 5fach verdünnten Lösung rund 60 % mehr. Hielt man die Substratkonzentration konstant und variierte darin die Konzentration der im Lösungsmittel vorhandenen Elektrolyte (hier NaCl), dann resultierte praktisch dasselbe Ergebnis. Eine hohe Salzkonzentration modellierte die pH-Aktivitätskurve im gleichen Sinne wie hohe Substratkonzentration, niedrige Salzkonzentration wie niedrige Substratkonzentration.

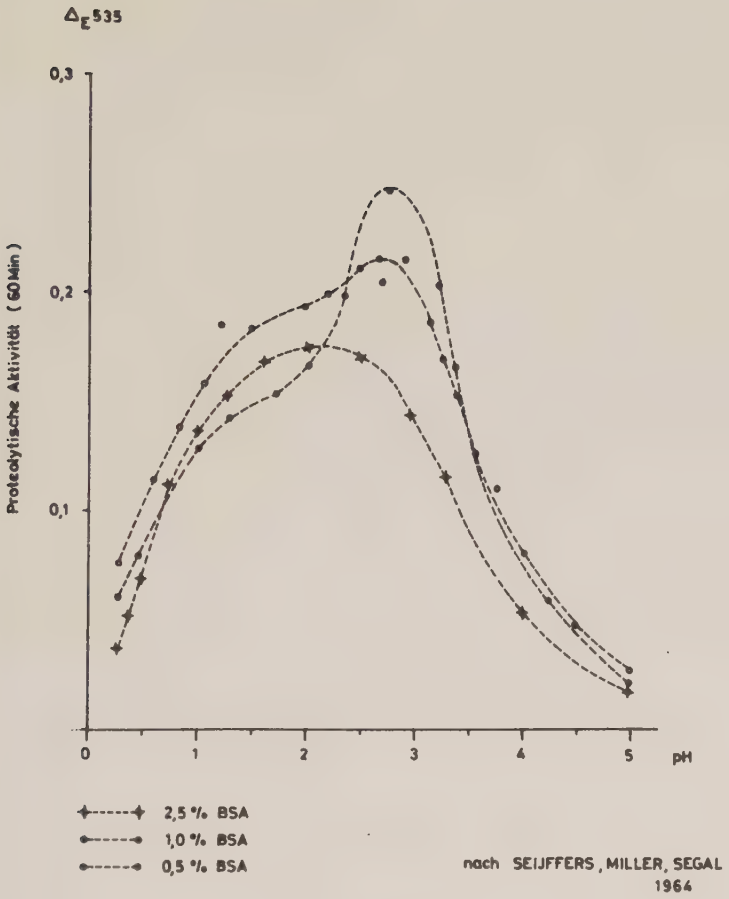


Abb. 4 Wirkung unterschiedlicher Substratkonzentrationen von Rinder-Serum-Albumin (BSA) auf die Pepsinolyse. Die proteolytische Aktivität von menschlichem Pepsin III, gemessen bei 535 nm ist aufgetragen gegen das pH der Inkubationslösung. (nach SEIJFFERS, MILLER, SEGAL 1964)

Auf ein ähnliches Phänomen haben SCHLAMOWITZ und PETERSON schon 1961 hingewiesen. Je geringer der Salzzusatz, um so besser kann sich das Substratmolekül bei gewissen pH-Stufen expandieren und umgekehrt. Dadurch wird es für das Enzym um so leichter bzw. schwerer zugänglich (BUCHS 1970).

Das Aussehen einer jeden pH-Aktivitätskurve läßt sich somit mittels Variation der Konzentration von Substrat oder Puffer nach Belieben manipulieren. Man kann daher nicht aus der Form einer pH-Aktivitätskurve auf die ihr zugrunde liegenden Enzyme schließen (SCHLAMOWITZ und PETERSON 1961; SEIJFFERS, MILLER, SEGAL 1964).

5. EINTEILUNG UND BIOCHEMIE DER MUCOSUBSTANZEN

Das als Inhibitor verwendete Chondroitinsulfat kommt im Bindegewebe in Seitenketten von Proteoglycanen vor. Besonders reich an Chondroitinsulfat ist der Knorpel. Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Chondroitinsulfat wurde aus Rindertrachea gewonnen.

Die Mucopolysaccharide lassen sich auf ein gemeinsames Bauprinzip zurückführen. Sie bestehen aus Disaccharideinheiten, in denen eine Uronsäure an die 3-Stellung eines acetylierten Aminozuckers glycosidisch gebunden ist. Diese Disaccharideinheiten sind in 1 - 4-Stellung zu einem linearen Makromolekül verknüpft; außerdem kann noch Schwefelsäure esterartig gebunden sein. Durch die Uronsäuren und die Schwefelsäurereste sind die Stoffe stark sauer. Neben der verbreiteten D-Glucuronsäure findet sich die L-Iduronsäure, die sich nur in der sterischen Anordnung am C-5 von der Glucuronsäure unterscheidet (KARLSON 1972).

GLASS, MORI und PANNER machten 1969 folgende Einteilung der Mucosubstanzen:

1.) Sulfatierte Mucosubstanzen

   a) sulfatierte Mucopolysaccharide
   b) sulfatierte Glycoproteine

2.) Nicht sulfatierte Mucosubstanzen

a) nicht sulfatierte saure Glycoproteine
b) nicht sulfatierte neutrale Glycoproteine

Obwohl diese Klassifikation auf Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Mucosubstanzen basiert, ist sie bis heute nicht vollständig gesichert. Es ist zum Beispiel nicht sicher, ob die sulfatierten Glycoproteine aus einer Anzahl von verschiedenen sulfathaltigen Proteinen bestehen, oder ob nur ein einzelnes Glycoprotein mit unterschiedlichem Sulfatgehalt vorhanden ist.

Für die Inhibierung der peptischen Aktivität ist die erste Gruppe der sulfatierten Mucosubstanzen interessant. Bei den sulfatierten Mucosubstanzen besitzen die sulfatierten Glycoproteine Uronsäure im Molekül, bei den sauren Mucopolysacchariden ist dagegen keine Uronsäure vorhanden (ANDERSON). Nach ANTANOPULOS (1974) existieren drei isomere Galaktosaminoglycane:

a) Ch-4-S früher Chondroitinsulfat A
b) Ch-6-S früher Chondroitinsulfat C
c) DS (Dermatinsulfat) früher Chondroitinsulfat B oder β-Heparin

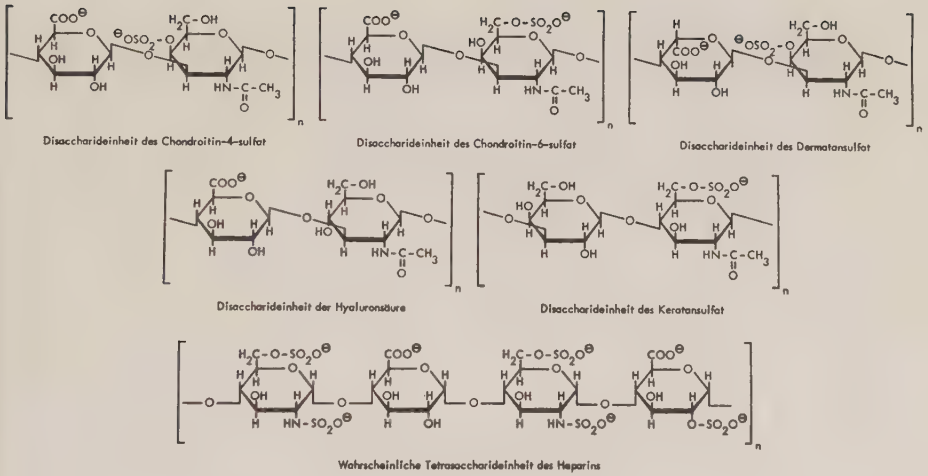


Abb. 5 Chemische Zusammensetzung saurer Mucopolysaccharide

(Grundriß der Biochemie von E. BUDDECKE, Berlin 1971)

Die sulfatierten Mucopolysaccharide Ch-4-S und Ch-6-S wurden im Magensaft des Menschen nur in minimalen Konzentrationen oder gar nicht gefunden, im Gegensatz zu den Hunden, bei denen deren Konzentration ziemlich hoch ist (GERALD, DE GRAEFF, LEY, GLASS 1967). Das Chondroitinsulfat wird bei Hunden zusammen mit Pepsin in den peptischen Zellen des Magenfundus gebildet.
ANDRE veröffentlichte 1971 eine Zusammenstellung von einigen Mucosubstanzen mit Angaben des Sulfatgehaltes:

1.) Sulfatierte Glycosaminoglycane

Heparin (42 % SO_3Na)
Ch-4-S (16,9 % SO_3Na)

2.) Sulfatierte Galactane

abgebautes λ-Carrageenan von Chondrus crispus (39,2 % SO_3Na)

3.) Sulfatierte Glycane

Dextransulfat (58 % SO_3Na)

4.) Sulfatierte Glycoproteine

von Mensch und Schwein (5 - 8 % SO_3Na)

Zu den nicht sulfatierten Mucosubstanzen gehört die Hyaluronsäure. Sie ist das einfachste Glied aus der Reihe der Mucopolysaccharide, aus Glucuronsäure und N-Acetyl-glucosamin aufgebaut und hat oben abgebildete Formel. Wahrscheinlich ist das Molekül unverzweigt oder fast unverzweigt.

Das Molekulargewicht von Hyaluronsäure ist sehr hoch (mehrere Millionen) KARLSON (1972). LEVEY und SHEINFELD fanden 1954, daß die Hyaluronsäure, welche ähnlich im Aufbau des Kohlenhydrats ist wie Chondroitinsulfat, aber nicht mit Schwefelsäure verestert ist, die Aktivität des Pepsins nicht inhibierte. ANDERSON berichtete 1961 ebenfalls, daß Natriumsulfat und verschiedene nicht sulfatierte Polysaccharide keine antipeptische Aktivität zeigten. Eine Hemmwirkung des Pepsins kommt somit nur dann vor, wenn eine Kombination von Polysaccharid mit Sulfatgruppen auftritt. Die einzelnen Komponenten haben anscheinend keine inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Pepsin.

5.1. Struktureller Aufbau des Chondroitinsulfates (Ch-6-S)

S. ARNOTT et al. (1973) haben mittels Röntgenstrahlenbeugung nachgewiesen, daß Ch-6-S in zwei bestimmten Strukturen vorkommt. Beide Strukturen bestehen aus Einzelhelices mit ähnlichen Disaccharidlängen (9,6 - 9,8 A), aber mit sehr verschiedenen Drehwinkeln zwischen den aufeinanderfolgenden Disacchariden (45^{o} und 120^{o}).

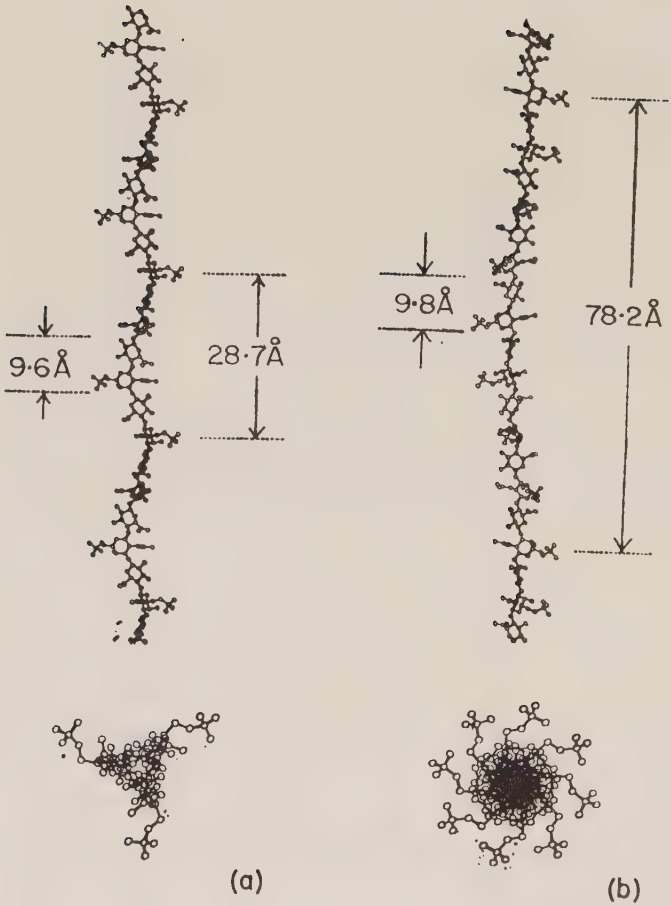


Abb. 6 Projektion von Modellen (parallel und senkrecht zur Helix-Achse) der Dreifachhelix (a) und der Achtfachhelix (b) des Chondroitin-6-sulfates (nach S-ARNOTT et al. 1973).

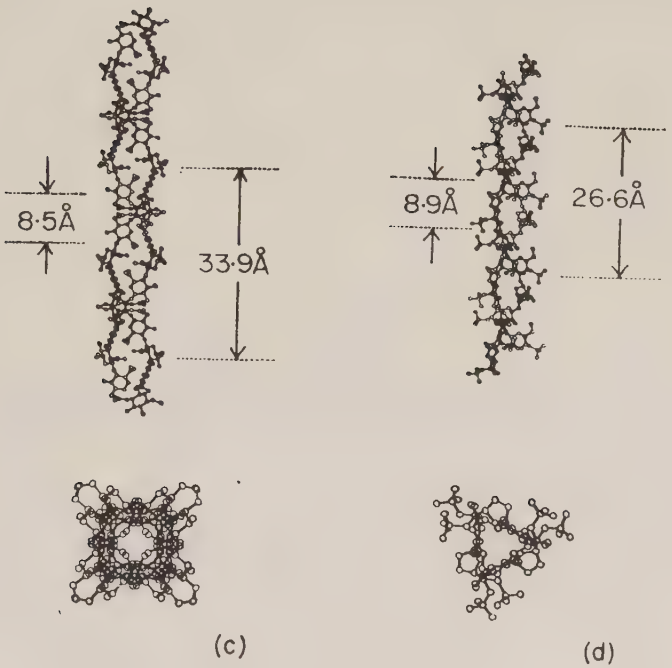


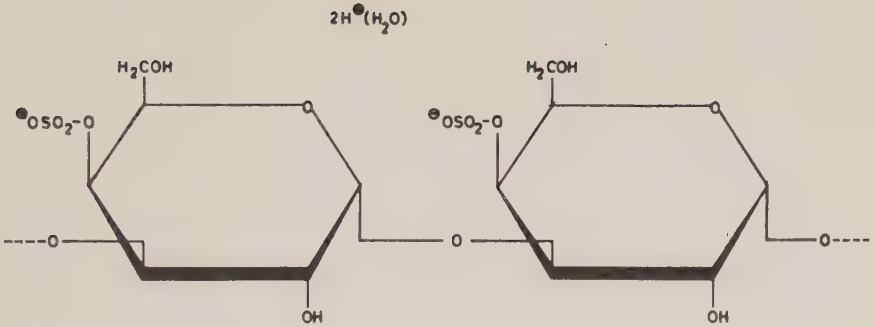
Abb. 7 Projektion von Modellen (parallel und senkrecht zur Helix-Achse) der Dreifachhelix (c) und der Achtfachhelix (d) des i-Carrageenans (S. ARNOTT et al. 1973)

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, ist die eine Struktur des Ch-6-S eine Dreifach-Helix, die andere eine Achtfach-Helix. Die Einzelhelices sind so gepackt, daß ihr Achsendurchmesser 14,3 Å für die Dreifach-Helix und 13,8 Å für die Achtfach-Helix beträgt. Die Moleküle haben zentrale Kerne mit Pyranoseresten, die am Rand mit geladenen Sulfatgruppen besetzt sind. Letztere sind die eigentlichen reaktiven Gruppen.

5.2. Struktureller Aufbau von Carrageenan

Von den übrigen Mucosubstanzen, die die peptische Aktivität zu hemmen vermögen, sei als eine der am intensivsten untersuchten Substanzen das sulfatierte Polysaccharid Carrageenan erwähnt. Carrageenan (auch Hyaluronsäure) besitzt im Gegensatz zum Chondroitinsulfat eine Doppelhelix mit kürzeren Disaccheridlängen (8,5 - 8,9 Å). Das Seetangpolysaccharid Carrageenan liegt in einer Dreifach-Doppel-Helix vor. Hier sind ebenfalls Intermolekularabstände der Helices von 14 Å gefunden worden. Dieser Molekularabstand scheint charakteristisch für die sulfatierte Mucopolysaccharide zu sein.

Man unterscheidet verschiedene Carrageenane je nach Herkunft: κ -, λ -, ι -Carrageenan (Abb. 8). Bei diesen



λ-Carrageenan

Abb. 8 Strukturformel von λ-Carrageenan
(nach HEINEKEN 1961)

wiederum unterscheidet man zwischen nicht abgebautem und abgebautem Carrageenan. Obwohl beide die peptische Aktivität durch die gleichen Mechanismen hemmen (Inhibitor + Substrat), bestehen doch beträchtliche Unterschiede im Grad der Hemmung. Abgebautes Carrageenan hemmt die peptische Aktivität wesentlich stärker.

Mol-Gewicht: abgebautes Carrageenan (C_{16}) 25.000
Mol-Gewicht: nicht abgebautes Carrageenan 800.000
(ANDERSON und BAILLIE 1967)

6. WIRKUNG DER SULFATIERTEN POLYSACCHARIDEN AUF DIE PEPTISCHE AKTIVITÄT

6.1. Inhibierung der peptischen Aktivität

ANDERSON stellte 1961 folgende Reihe der antipeptischen Aktivität von einigen sulfatierten Polysacchariden auf, wobei die Stärke der antipeptischen Aktivität von Heparin nach Chondroitinsulfat hin abnimmt:

1. Heparin
2. abgebautes Carrageenan
3. Fucoidan
4. Chondroitinsulfat

Die Reihenfolge der sulfatierten Polysaccharide hinsichtlich der antipeptischen Aktivität geht parallel mit dem Gehalt an Sulfatresten in diesen Substanzen. COOK et al. fanden 1963 ebenfalls in ihrer Untersuchung der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften von 24 verschiedenen, synthetisch gewonnenen, sulfatierten Polysacchariden, daß die mit einem hohen Sulfatgehalt und einem großen Molekulargewicht eine deutlich erhöhte antipeptische Aktivität besitzen.

In den Untersuchungen von ANDRE, LAMBERT, HARTHILL und ANDERSON von 1971 war die Gruppe von Makroanionen mit einem Sulfatestergehalt von mehr als 36 % (Heparin, Carrageenan) deutlich aktiver als Chondroitinsulfat (16 % Sulfatester), und dieses war wiederum aktiver als die sulfatierten Glycoproteine (Sulfatgehalt 5 - 9 %). Im Jahre 1967 berichtete COOK außerdem, daß auch die antiulcerogene Aktivität der Mucosubstanzen auf den Gehalt an Schwefel bezogen ist.

Von besonderem Interesse ist der Effekt des pH auf die Aktivitätshemmung des Pepsins, weil der Magensaft verschiedene Proteasen mit unterschiedlichen pH-Optima für die Proteolyse enthält (TANG, WOLF et al. 1959; TAYLOR 1962; SEIJFFERS, MILLER et SEGAL 1964).

Der Verlauf der pH-Aktivitätskurven ist abhängig von der Ionenstärke und den verwendeten Substraten. Eine ähnliche Abhängigkeit besteht auch für die Pepsinhemmung durch die Benutzung verschiedener Hemmstoffe.

1967 haben ANDERSON und BAILLIE die Inhibierung der peptischen Aktivität von menschlichen Magensäften durch nicht abgebautes und abgebautes Carrageenan bei pH-Werten von 1,5 bis 3,7 untersucht. Sie verwandten einen Glycinpuffer und eine Modifikation der RISA-Methode. Die Inhibierung durch abgebautes Carrageenan erwies sich als konstant über den gesamten Bereich. D. h.: Die Veränderung des pH's des Mediums in den obigen Grenzen hatte keinen Einfluß auf die Inhibierung durch Carrageenan. Dagegen nahm die Hemmung durch nicht abgebautes Carrageenan von pH 2,5 auf 3,5 ab. ANDRE et al. berichteten 1971, daß der Wechsel des pH (1,6; 2,6; 3,0) keinen Einfluß auf die Hemmung des Pepsins durch sulfatierte Glycoproteine hatte (Methode RISA).

Die gleichen Autoren schreiben, daß auch bei den sulfatierten Polysacchariden ein Wechsel im pH über den Bereich von pH 1,6 - 3,5 keinen Effekt zeigt, weder auf die Inhibierung, die bei jedem pH gleich ist, noch auf die Stabilität des Komplexes (Methode RISA). Es wurde von ANDRE et al. ein Inhibitor-Substrat-Komplex angenommen.

Nach SMYTH, BODI et al. (1974) tritt in vitro mit synthetischen Substraten wie APDT keine Hemmung durch sulfatierte Polysaccharide ein. APDT (N-Acetyl-L-phenylalanin-L-3, 5-diiodtyrosin) ist ein niedrigmolekulares, pepsinspezifisches Substrat.

6.2. Stimulierung der peptischen Aktivität

Pepsin entsteht aus der inaktiven Vorstufe Pepsinogen. Schon 1938 fand HERRIOT, daß unterhalb von pH 5 eine Pepsinogen-Aktivierung mit Freisetzung eines Inhibitors beobachtet wurde:

Pepsinogen → Pepsin + Inhibitor + Peptide

Dieser Vorgang ist sozusagen der physiologische Weg, auf dem Pepsin entsteht. ANDERSON (1969) und HOROWITZ (1970) berichteten, daß Heparin und Chondroitinsulfat die Umwandlung von Pepsinogen zu Pepsin zu beschleunigen vermögen. Die Wirkung der an sich als Inhibitoren wirkenden Substanzen kommt bei einer Konzentration vor, die niedriger ist als die, welche für die Pepsinhemmung notwendig ist. Sie kommt nicht vor bei pH 5 oder höher. Letzteres dürfte auf die sofortige Pepsininaktivierung ab pH 5 zurückzuführen sein. ANDERSON und auch HOROWITZ nahmen eine Interaktion des Chondroitinsulfats mit dem Inhibitor an, der bei der Aktivierung aus Pepsinogen frei wird.

6.3. Nebenwirkung der Pepsininhibitoren

Von einem der Pepsin-Inhibitoren, nämlich von Carrageenan ist schon länger bekannt, daß es Ulcerationen (Ulcus disease) im Colon macht, zumindestens bei folgenden Tierspezies:

Meerschweinchen
Kaninchen
Ratten
Mäuse und
Rhesusaffen

Die dazu nötigen Konzentrationen können sehr gering sein. So reicht schon weniger als 1 g abgebautes Carrageenan pro Liter, das über einen Zeitraum von 3 Monaten einem Kaninchen gegeben wird, aus, um bei diesem Ulcerationen des Colons hervorzurufen (MARCUS, WATT u. PATH 1974). Diese Ulcerationen wurden auch bei Gabe von anderen sulfatierten Polysacchariden, die nicht vom Seetang abstammten, zum Beispiel beim Amylopectinsulfat, gefunden (MARCUS, WATT und PATH 1974).

6.4. Mechanismen der antipeptischen und antiulcerativen Wirkung der sulfatierten Polysaccharide

6.4.1. in-vitro-Untersuchungen

L. B. JAQUES beobachtete 1943, daß sulfatierte Polysaccharide sich mit Proteinen verbinden können und auf diese Weise Gebilde mit neuen physikalischen und chemischen Eigenschaften bilden. Nach LAMBERT (1972) sind Polyanionen bei niedrigem pH an ein Proteinsubstrat gebunden und schützen dieses dadurch gegen proteolytische Enzyme.

ANDERSON hat 1961 die relative Affinität von einigen Proteinen für abgebautes Carrageenan untersucht (s. Abb. 9). In dem Versuch wurde abgebautes Carrageenan sowohl allein als auch zusammen mit Pepsin, Plasmaprotein, Mucoprotein und Hämoglobin zu einer Toluidin-Blau enthaltenden Lösung hinzugegeben. Das abgebaute Carrageenan vermag den Farbstoff aus der Lösung zu entfernen. Wenn die entsprechenden Rezeptoren für den Farbstoff zum Beispiel durch Pepsin, Mucoprotein oder Hämoglobin besetzt sind, nimmt die Toluidin-Blau-Entfernung aus der Lösung mehr oder weniger stark ab, je nach Anzahl der besetzten Rezeptoren. Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß die Affinität des abgebauten Carrageenans für das Pepsin geringer ist als für Plasmaprotein, Hämoglobin oder Magen-Mucoprotein; denn nach Zusammenbringen von abgebautem Carrageenan mit Hämoglobin wird wesentlich

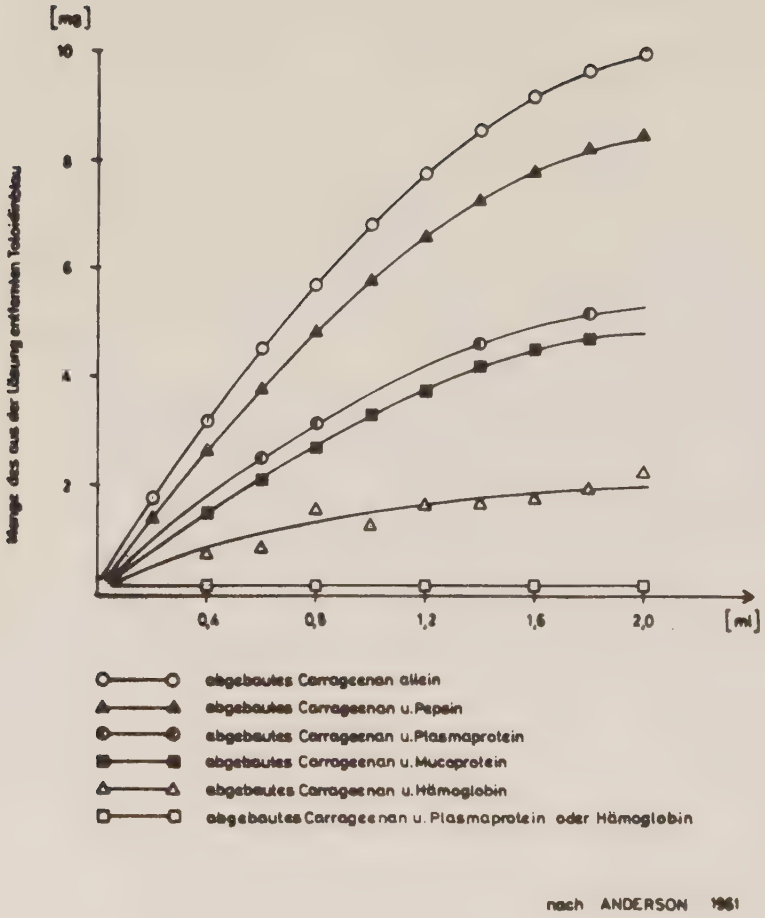


Abb. 9 Relative Affinitäten einiger Proteine zu abgebautem Carrageenan. Bestimmung erfolgte mittels Toluidin-Blau. (ANDERSON 1961)

weniger Farbstoff aus der Lösung entfernt als bei Zugabe gleicher Mengen von Pepsin. Daraus folgt nach ANDERSON, daß die Höhe der Konzentrationen an aktuellem Pepsin nicht so wichtig für die definitive Größe der Inhibierung ist wie die Höhe der Konzentration an Protein-Substrat.

J. C. HOUCK et al. stellten 1960 bei Untersuchungen des Carrageenans mit Serumalbumin als Substrat fest, daß eine kompetitive Hemmung vorlag (Abb. 10).

Über den Mechanismus der antiulcerativen Wirkung gibt es mehrer verschiedene Theorien, die sich zu widersprechen scheinen. Danach verbinden sich:

1.) Hemmstoff + Enzym = Inaktivierung bzw. Hemmung des Pepsins (direkt)

2.) Hemmstoff + Substrat = Schutz des Substrates vor dem Enzym Pepsin (indirekt)

3.) Hemmstoff + Magenschleim = Verhinderung der Pepsindiffusion, damit Ulcusverhütung

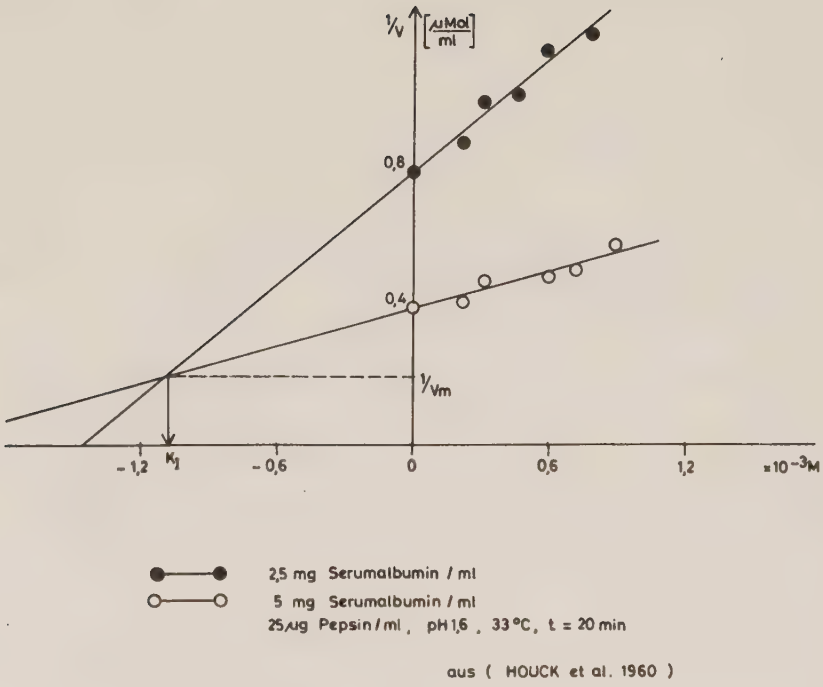


Abb. 10 Bestimmung des Hemmtyps (nach DIXON 1953)

Wie bereits oben beschrieben, bewirkt die Verwendung verschiedener Substrate, Hemmstoffe und Bestimmungsmethoden eine Änderung des Verlaufes der Hemmkurven. Zusätzlich fanden ANDERSON und WATT bereits im Jahre 1959, daß das Ausmaß der Inhibierung der peptischen Aktivität durch abgebautes Carrageenan nicht nur mit dem Typ, sondern auch mit der Konzentration des verwendeten Substrates variierte. Die Untersuchungen wurden mit Hämoglobin, Casein und Plasmaprotein als Substrat durchgeführt.

LEVEY und SHEINFELD führten 1954 unter Anwendung der ANSON-Methode Versuche mit Casein als Substrat und Heparin bzw. Chondroitinsulfat als Inhibitoren durch. Sie stellten bei diesen in-vitro-Versuchen die These auf, daß sich Enzym und Inhibitor verbänden. Es wurde nämlich Heparin und Chondroitinsulfat mit einem Überschuß von Casein vor Zugabe des Pepsins inkubiert. Hierbei fanden die obigen Autoren keine Inhibierung des Pepsins. Dieses wurde von ihnen so interpretiert, daß die Inhibierung der peptischen Aktivität durch sulfatierte Polysaccharide in einer Komplexbildung zwischen Enzym und Inhibitor resultierte.

Über die Natur der Verbindung des sulfatierten Polysaccharids Carrageenan (Ebimar) mit dem Proteinsubstrat gab es bis 1961 kaum Studien. Aber es gab Untersuchungen über die Natur der Verbindung von Heparin, das auch ein sulfatiertes Polysaccharid ist, mit Proteinen.

FISCHER und ASTRUP fanden 1935, daß die Verbindung zwischen Heparin und Protein in einer Verbindung eines einfachen Salzes bestand, dessen Dissoziation nach dem Massenwirkungsgesetz vonstatten ging. Sie stellten auch fest, daß sich diese Kombination von Heparin mit Protein auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes bildete.

Isoelektrische Punkte: (PIPER u. FENTON 1961)

Pepsin	1,0
Eier-Albumin	4,6
Serum-Albumin	4,8
Hämoglobin	6,8
Casein	4,7

PIPER und FENTON verwendeten 1961 Serumalbumin als Substrat, als Inhibitoren Heparin und Carrageenan (Ebimar). Sie arbeiteten nach der RISA-Methode und mit Hilfe von Elektrophoresen. Sie waren der Ansicht, daß ein Komplex zwischen Inhibitor und Substrat vorliegen müsse, weil ein zwanzigfacher Anstieg der Pepsinkonzentration die Hemmwirkung des Carrageenans nur wenig verändert hatte. Es lag daher nach ihrer Meinung keine Interaktion zwischen Pepsin und Inhibitor vor (s. Abb. 11).

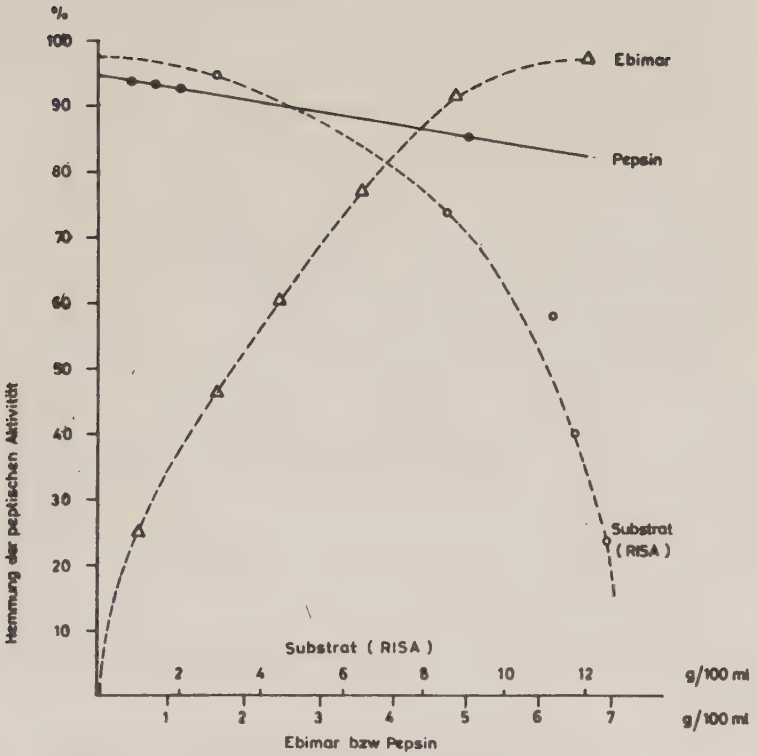


Abb.11 Nachweis der Komplexbildung zwischen Substrat(RISA) und Hemmstoff (Carrageenan) nach PIPER u. FENTON 1961

●——● Substrat - Hemmstoffkomplex : Zugabe von Pepsin
Ergebnis : sehr geringe Hemmungsverluste

△----△ Pepsin plus Substrat : Zugabe von Hemmstoff
Ergebnis : Hemmung steigt stark an

o----o Substrat - Hemmstoffkomplex (neben Pepsin) : Zugabe von Substrat
Ergebnis : Hemmung sinkt ab

Im Jahre 1961 fand ANDERSON, ähnlich wie auch PIPER und FENTON folgendes heraus: Der Anstieg der Konzentration des abgebauten Carrageenans (mit entweder Plasmaprotein oder Hämoglobin als Substrat und konstanten Enzym- und Substratmengen) verursachte einen Anstieg der Inhibierung des Enzyms. Dabei war der Effekt unabhängig von der verwendeten Enzymkonzentration. Die Autoren LEVEY und SHEINFELD (1954) waren von einem Inhibitor-Enzym-Komplex ausgegangen. Nach Meinung von ANDERSON kann dies nicht der Fall sein. Man hätte dann nämlich erwarten dürfen, daß die Hemmung der peptischen Aktivität mit einer viel niedrigeren Konzentration eines sulfatierten Polysaccharids ebenfalls erfolgen könnte, als dies tatsächlich der Fall war, und die Hinzugabe von exzessiven Substratmengen sollte nicht den Grad der Hemmung erniedrigen. Aus den Untersuchungen ANDERSONS sowie PIPER und FENTONS ist aber zu ersehen, daß bei ansteigenden Konzentrationen des Substrates die Inhibierung vermindert wird und bei abnehmenden Enzymkonzentrationen der Grad der Inhibierung nicht verändert wird. Man hätte erwarten können, daß die Hemmung ansteigt, wenn die Reaktion tatsächlich durch eine inaktivierende Komplexbildung zwischen Enzym und Inhibitor bedingt gewesen wäre. Nach Meinung von ANDERSON ist anscheinend das Verhältnis von Proteinsubstrat zum sulfatierten Polysaccharid bestimmend für den Grad der Inhibierung, d. h. je mehr Inhibitor, desto mehr antipeptische Aktivität.

Untersuchungen von BERARD, MARTIN und LAMBERT von 1967, bei denen sie die Geldiffusionstechnik anwendeten, ließen die Autoren zu dem Schluß kommen, daß die Hemmung der Proteolyse durch Polysaccharidsulfate eher auf einem Schutz des Substrates als auf einer Inaktivierung des Enzyms beruhe. Auch M. SAMLOFF ist nach seinen Untersuchungen (1971) mittels Elektrophorese und Geldiffusion der Ansicht, daß die Verhinderung der peptischen Hydrolyse durch Makroanionen aus der Wirkung des negativ geladenen Inhibitors auf das positiv geladene Substrat resultiert. ANDERSON und BAILLIE schrieben 1968, daß nach ihren Untersuchungen nicht nur bei Verwendung eines Plasma-Protein-Substrates, sondern auch bei Verwendung von Hämoglobin die Inhibierung durch einen Substrat-Inhibitor-Komplex gebildet wird. Auch andere Macro-anionen mit unterschiedlichen Aniongruppen und einer Polysaccharidstruktur sind ähnlich im Mechanismus der Hemmung, was nach Meinung von ANDERSON und BAILLIE anzeigt, daß dies anscheinend der generelle Typ der Hemmung ist.

Nach Angaben von obigen Autoren waren die Resultate mit gereinigtem Pepsin und Gastricsin ähnlich denen mit ungereinigtem Magensaft. Das zeigte, daß die Nicht-Enzym-Komponenten des Magensaftes keinen inhibitorischen Effekt besitzen.

Grundsätzlich geschieht anscheinend folgendes: Die negativ geladenen Sulfatgruppen der Inhibitoren verbinden sich mit dem positiv geladenen Gruppen in den

Proteinmolekülen (ANDERSON und WATT 1959). Und dieses geschieht bei einem pH, das niedriger ist als der isoelektrische Punkt des Hämoglobins, Albumins oder des Caseinsubstrates (ANDERSON, BAILLIE, HARTHILL 1968; MARTIN, VUEZ, BERARD 1968).

Eine in-vitro-Untersuchung von ANDERSON aus dem Jahre 1961 mit abgebautem Carrageenan als Inhibitor demonstriert noch einen anderen Effekt, nämlich den, daß die Mucopolysaccharide, d. h. also die Inhibitoren, die Mucosa des Magens vor dem aggressiven Magensaft (HCl und Pepsin) zu schützen vermögen, indem sie mit dem Mucoprotein der Magenschleimhaut reagieren und so die Pepsinpassage durch das Mucin verhindern. Ob der Inhibitor dabei zuerst mit dem Enzym oder zuerst mit dem Substrat gemischt worden war, ergab nur einen geringen bis gar keinen Unterschied (Methode HUNT).

6.4.2. In-vivo-Untersuchungen

Die bis jetzt beschriebenen Wirkungsarten der sulfatierten Polysaccharide beruhen auf In-vitro-Untersuchungen, die von verschiedenen Autoren durchgeführt wurden.

Bei In-vivo-Untersuchungen der Hemmwirkung der sulfatierten Carrageenane konnten SMYTH, BODI et al. (1974) keine Verminderung der peptischen Aktivität

feststellen. Sie erklären das folgendermaßen: Bei dem pH des Magenmilieus (pH > 1), wenn keine Speisen im Magen vorhanden sind, liegen die Magenproteasen überwiegend in Anionform vor. Eine komplexe Verbindung zwischen sulfatiertem Polysaccharid und Protein beinhaltet jedoch ein Zusammentreffen des Anionsulfats mit dem Kationprotein. Diese "Interaktion" mit den Magenproteasen kann sich aber bei jenem sauren Milieu (pH > 1) des Magens nicht immer in signifikantem Ausmaß ereignen. SMYTH, BODI et al. (1974) fanden jedoch eine andere Wirkungsweise des Carrageenans. Diese bestand in einer physikalischen Veränderung des Magenschleimes. Der Magenschleim, der typischerweise fadenförmig und säulenförmig als elastisches Gel auftritt, verwandelte sich in eine flockige Masse oder in einen gleichmäßigen trüben Magensaft. Ähnliches berichteten auch SUN und RYAN (1970), ANDERSON, BAILLIE und HARTHILL (1968). ANDERSON (1961) und MARTIN, VUEZ, BERARD (1968) berichten weiterhin, daß ebenfalls ein proteasenresistenter Komplex mit Proteinen der Magenschleimhaus gebildet wird. ANDERSON hat nach Gabe von Ebimar dieses diffus verteilt auf der Magen- und Duodenalschleimhaut von Meerschweinchen gefunden. Gleiches fand er bei menschlichen Gastrektomiepräparaten, wenn den betreffenden Personen 5 Std. vor der Gastrektomie Ebimar gegeben worden war. Ebimar war mit der Magenschleimhaut eine biochemische Verbindung eingegangen, so daß es sich nicht durch Waschen von der Schleimhaut trennen ließ.

Zusammenfassend muß man wohl bei der Untersuchung

der Wirkungsweise der sulfatierten Polysaccharide die in-vitro-Wirkung von der Wirkung in vivo unterscheiden. Bei der In-vitro-Wirkung liegt anscheinend eine Komplexbildung zwischen dem negativ geladenen sulfatierten Polysaccharid und dem positiven Proteinsubstrat vor. Bei der in-vivo-Wirkung wird außerdem oder ausschließlich durch Komplexbildung mit dem Magenschleim und der Magenschleimhaut eine Proteasenresistenz geschaffen, die die Ulcusentstehung verhindern kann.

7. ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN

Die Ätiologie der Ulcuskrankheit ist unumgänglich mit der Einwirkung von HCl und Pepsin auf das Gewebe des Magens und Duodenums verbunden. HCl allein ruft keine Ulcera hervor. Die Hemmung des Pepsins scheint somit eine Möglichkeit zu bieten, Ulcera zu verhindern oder wenigstens zu heilen.

Bei dem Studium der Literatur über die Pepsinhemmung erschien die Hemmung durch sulfatierte Polysaccharide besonders interessant. Die Anwendung sulfatierter Polysaccharide, insbesondere des Carrageenans, in der Therapie seit Beginn der sechziger Jahre, insbesondere in Frankreich, Spanien, Italien, in der Schweiz und in England unter dem Namen Ebimar hat ergeben, daß durch diese Substanz tatsächlich ein Einfluß auf den Heilungsverlauf der Ulcuserkrankung ausgeübt wird. So haben S. BONFILS (1968) et al. in der ersten Hälfte der sechziger Jahre unter anderem 150 Ulcuspatienten mit dem sulfatierten Polysaccharid Carrageenan behandelt. In 75 % der Fälle trat innerhalb eines Monats eine Besserung im Befinden der Patienten ein. Ebimar hat allerdings Nebenwirkungen. Insbesondere kann es im Colon Ulcera hervorrufen, weshalb sich diese Substanz wohl nie richtig durchsetzte.

Wie auch immer, der Wirkungsmechanismus, durch den die sulfatierten Mucosubstanzen die Pepsinhemmung hervorrufen, ist bis zum heutigen Tage nicht vollständig geklärt. Speziell über die Wirkung des

sulfatierten Chondroitinsulfates ist relativ wenig geschrieben worden. Zwar wird immer wieder erwähnt, daß Chondroitinsulfat das Pepsin zu hemmen vermag, aber viele weitergehende Untersuchungen wurden mit diesem Stoff nicht durchgeführt.

7.1. Entwicklung einer einfachen Methode zur Bestimmung der Pepsinaktivität

Die Bestimmungsmethoden der proteolytischen Pepsinaktivität, die bisher verwendet worden sind, wurden sämtlich mit unterschiedlichen Methoden, Substraten und Inhibitoren durchgeführt. Daher war es unser Anliegen, eine einfache, d. h. leicht durchzuführende Methode zu präsentieren, die geeignet ist, in Reihenversuchen Verwendung zu finden, so daß durch Vereinheitlichung der Versuche die einzelnen Ergebnisse miteinander vergleichbar werden. Wir stützten uns dabei auf Untersuchungen von RÜCK, SCHULT et al., die eine modifizierte ANSON-Methode (Hämoglobin) verwendeten.

7.2. Untersuchung über die optimale Bezugsgröße für den Grad der Hemmung der peptischen Aktivität

Bei der Bestimmung des Grades der Pepsinhemmung durch Chondroitinsulfat in Abhängigkeit vom pH muß als Bezugsgröße die Pepsinaktivitätskurve ohne Chondroitinsulfat verwendet werden. Hierbei trat das Problem auf, die optimale Bezugsgröße, d. h. die richtige Pepsinaktivitätskurve in Abhängigkeit von pH zu finden. Denn das Aussehen der Pepsinaktivitätskurven ändert sich, wie bereits oben beschrieben wurde, bei Veränderung von Ionenstärke und Art des Substrates.

7.3. Untersuchung über die Hemmung der proteolytischen Aktivität durch Chondroitinsulfat

Nachdem von SCHULT et al. gefunden worden war, daß menschlicher Magensaft gegenüber Rinderhämoglobin im pH-Bereich zwischen pH 2 und pH 3 seine optimale Wirkung zeigte, sollten die vorliegenden Untersuchungen zeigen, in welchem Ausmaß die proteolytische Aktivität von menschlichem Magensaft durch sulfatierte Polysaccharide, speziell Chondroitinsulfat, bei Verwendung von Rinderhämoglobin als Substrat gehemmt wird.

7.4. Untersuchung über die Eignung von Chondroitinsulfat als Therapeutikum bei Ulcus ventriculi und Ulcus duodeni

Als vierter Gesichtspunkt sollte untersucht und erörtert werden, ob Chondroitinsulfat als Ulcustherapeutikum geeignet erscheint. Es sollte hier auch besonders die Frage untersucht werden, ob es Unterschiede in der Hemmwirkung des Chondroitinsulfates bei Ulcus ventriculi und Ulcus duodeni gibt.

8. MATERIAL UND METHODIK

8.1. Material

8.1.1. Reagenzien für die Bestimmung der peptischen Aktivität

		Charg. Nr.
NaCl p. a.	MERCK AG	1346340
Glycin p. a.	MERCK AG	1330535
TCA p. a.	MERCK AG	1372838
HCl p. a.	MERCK AG	
Hämoglobin Proteasesubstrat nach ANSON f.biochem.Zwecke	MERCK AG	6341338
Chondroitinsulfat-Na-salz reinst, leichtlöslich aus Lig.nuchae vom Rind	SERVA	17120
Chondroitinsulfat pract., ca.70 %, 15 - 20 % Protein	FLUKA	9724181

8.1.2. Herstellung der Rinderhämoglobinlösung

Die als Substrat verwandte Rinderhämoglobinlösung wurde folgendermaßen hergestellt: Zu 200 ml HCl (pH 2,5) wurde 6 g Hämoglobin (Rind) hinzugegeben. Diese Lösung wurde nach pH-Nachstellung mit 10 m HCl auf pH 2,5 für 10 min. auf 96 °C erhitzt und

anschließend filtriert. Dann wurde ihr Proteingehalt vor der Verwendung mit Hilfe der Methode nach LOWRY et al. (1951) bei 750 nm ermittelt.

8.1.3. Herkunft der Magensäfte

Das Sammeln der Magensäfte erfolgte nach FEIFEL, LORENZ et al. (1972). Es wurden ausschließlich native Magensäfte von insgesamt 36 verschiedenen Personen untersucht. Von einigen dieser Patienten wurde zwei oder drei Mal (an verschiedenen Tagen) Magensäfte gewonnen. Insgesamt ergaben sich daher 71 verschiedene Magensäfte, die untersucht wurden.

Bei den untersuchten Personen verschiedenen Alters handelte es sich

1. um Normalpersonen
2. um Patienten, denen im Rahmen von Routineuntersuchungen oder Erstuntersuchungen im Magensaftlabor der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg Magensaft entnommen wurde, d. h. Patienten mit
   a) Ulcus duodeni
   b) Ulcus ventriculi
   c) Zustand nach selektiver Vagotomie und Pyloroplastik
   d) Magencarcinom

Die Magensaftgewinnung wurde beschleunigt durch:

a) Pentagastrin (Gastrodiagnost ^{R})
b) Pentagastrin + Insulin
c) Insulin (Altinsulin; HOECHST, Frankfurt)

8.2. Methodik

Es sollte die gesamte aktuelle proteolytische Aktivität des Pepsins der jeweiligen Magensäfte bestimmt werden. Die Messungen erstreckten sich auf den pH-Bereich der maximalen Wirkung der im Magensaft vorhandenen Proteasen und der daran angrenzenden Bereiche (pH 1 - 4). Mittels der Hämoglobinspaltung nach ANSON, modifiziert nach SCHULT et al. (1974), wurde die peptische Aktivität des nativen menschlichen Magensaftes spektrophotometisch bei 278 nm gemessen.

8.2.1. Versuchsanordnung

1 ml einer 3 %igen Hämoglobinlösung pH 2,5 wurde mit 1,2 ml 1 %iger (variiert) Chondroitinsulfatlösung (in Glycin-HCl-Puffer) und 0,8 ml 0,05 M Glycin-HCl-Puffer pH 2,5 versetzt. Durch Zugabe von 0,02 ml (variiert) Magensaft wurde die enzymatische Reaktion in einem Wärmebad bei 25 ^{o}C gestartet.

Die Reaktion wurde nach 10 min. durch Zugabe von 5 ml einer 5 %igen Trichloressigsäure gestoppt. Das mit Trichloressigsäure gefällte hochmolekulare Hämoglobin wurde dann bei 3800 x g 20 min lang zentrifugiert. Danach wurde bei 278 nm die Absorption der aromatischen Aminosäuren, der Oligo- sowie kurzkettigen Polypeptidketten im Überstand gemessen, die durch die proteolytische Spaltung des säuredenaturierten Hämoglobins entstanden waren. Diese Absorption "tyrosinähnlicher" Substanzen ist ein direktes Maß für die proteolytische Aktivität des Magensaftes.

9. ERGEBNISSE

9.1. Pepsin-Aktivitätskurve in Abhängigkeit vom pH, ohne Zusatz von Chondroitinsulfat

Im Gegensatz zu mehreren Untersuchungen (TAYLOR 1959, PIPER und FENTON 1965) und in Übereinstimmung mit MASCH und HUCHTING (1955) fanden wir bei unseren Untersuchungen mit Hämoglobin als Substrat und Glycin-HCl-Puffer und bei unserer Methode stets eine eingipflige pH-Aktivitätskurve des Pepsins. Als Beispiel seien zwei pH-Aktivitätskurven desselben Magensaftes dargestellt, wobei jedoch unterschiedliche Magensaftmengen eingesetzt wurden (Abb. 12).

Bei sämtlichen Pepsin-Aktivitätskurven, die während aller Versuche jeweils als Bezugsgröße für die prozentuale Hemmung bzw. Stimulierung der peptischen Aktivität durch Chondroitinsulfat mitgemessen wurden, findet sich das Maximum der peptischen Aktivität zwischen pH 2 und 2,5. Dann folgte ein Abfall der peptischen Aktivität gegen pH 4. Eine Verringerung der Magensaftkonzentration durch geringere Magensaftzugabe bewirkte eine Verringerung der Extinktion, wobei die Kurvenform erhalten blieb.

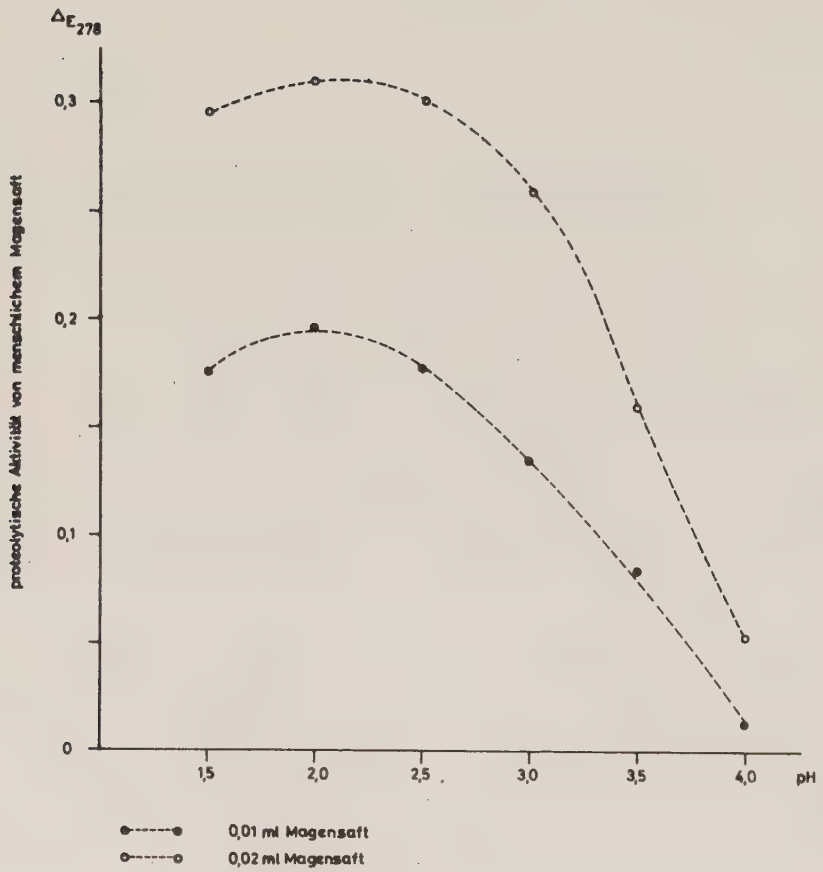


Abb. 12 pH-Aktivitätskurven von menschlichem Magensaft (0,01 ml bzw. 0,02 ml menschlicher Magensaft) 1 ml 3 % Hb, 2 ml 0,05 M Gly-NaCl-Puffer (pH 2,5) + MS, Inkubation bei 25 °C, nach 10 min. Reaktionsstop mit 5 ml 5 % TCL.

9.2. Untersuchung über die Wirkung von unterschiedlichen Chondroitinsulfat-Konzentrationen (Ch's) auf die peptische Aktivität (Tab. 1/Abb. 13)

Die Änderung der pH's im umgebenden Milieu hat einen Einfluß auf die Hemmung der peptischen Aktivität durch Chondroitinsulfat. Chondroitinsulfat vermag, abhängig von pH und Konzentration, sowohl die Aktivität des Pepsins zu hemmen, als auch zu stimulieren. Bei niedrigem pH und niedrigen Konzentrationen tritt eine Stimulierung bis zu ca. 10 - 20 % ein. Bei 0,2 % und 0,15 % Ch·S tritt diese Stimulierung ab pH 3,5 ein. Bei 0,28 % Ch·S findet sich erst bei ca. pH 2,7 das Auftreten einer Stimulierung. Bei 0,34 % Ch·S tritt bei pH 2 Stimulierung ein. Bei 0,4 % Ch·S ist nur noch Hemmung zu finden.

Das Hemmungsmaximum verschiebt sich bei niedriger werdenden Konzentrationen des Chondroitinsulfates von pH 3 - 3,5 bei 0,4 % Ch·S zu pH 3,5 bei 0,34 % Ch·S bzw. pH 4 bei 0,28 %, 0,2 %, 0,15 % Ch·S. Bei niedrigeren Konzentrationen als 0,4 % Ch·S tritt sowohl Hemmung als auch Stimulierung ein. Wenn man die Hemmungskurve bei 0,4 % u. 0,5 % betrachtet, so findet man, daß die geringste Hemmung bei niedrigen pH-Werten, die größte Hemmung jedoch zwischen pH 3 und 3,5 eintritt. Dann erfolgt wieder ein Abfall in der Hemmungsstärke.

Konz. im Ansatz	pH 1,5		pH 2		pH 2,5		pH 3		pH 3,5		pH 4	
0,5 % CS	63,25	±11,0	42,65	±7,0	30,3	± 9,7	19,2	± 8,3	15,35	± 9,3	42,5	±10,2
0,4 % CS	94,15	±14,9	67,41	±8,0	48,5	±11,0	18,2	± 3,2	18,7	± 2,5	46,0	±12,3
0,34 % CS	116,72	±14,6	101,47	±6,9	84,8	± 8,4	55,9	±10,8	35,9	± 7,0	50,1	± 2,7
0,28 % CS	113,68	±14,0	109,1	±5,6	106,4	± 9,7	93,9	±10,7	76,7	±12,5	72,3	±17,0
0,21 % CS	113,87	± 8,0	107,7	±4,3	111,5	± 5,3	105,8	± 7,2	106,4	± 5,1	60,8	± 3,8
0,15 % CS	111,35	±10,7	108,5	±4,5	117,5	± 4,0	110,2	± 7,7	103,8	±12,6	65,7	± 7,6

Tab. 1

Prozentuale Mittelwerte mit Standardabweichungen der proteolytischen Aktivität von 71 menschlichen Magensäften nach Zusatz von Chondroitinsulfatlösungen unterschiedlicher Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH in Bezug auf die peptische Aktivität der nativen Magensäfte. Versuchsbedingungen siehe Methodik.

Werte < 100 geben den Grad der Hemmung an

Werte > 100 geben den Grad der Stimulierung an.

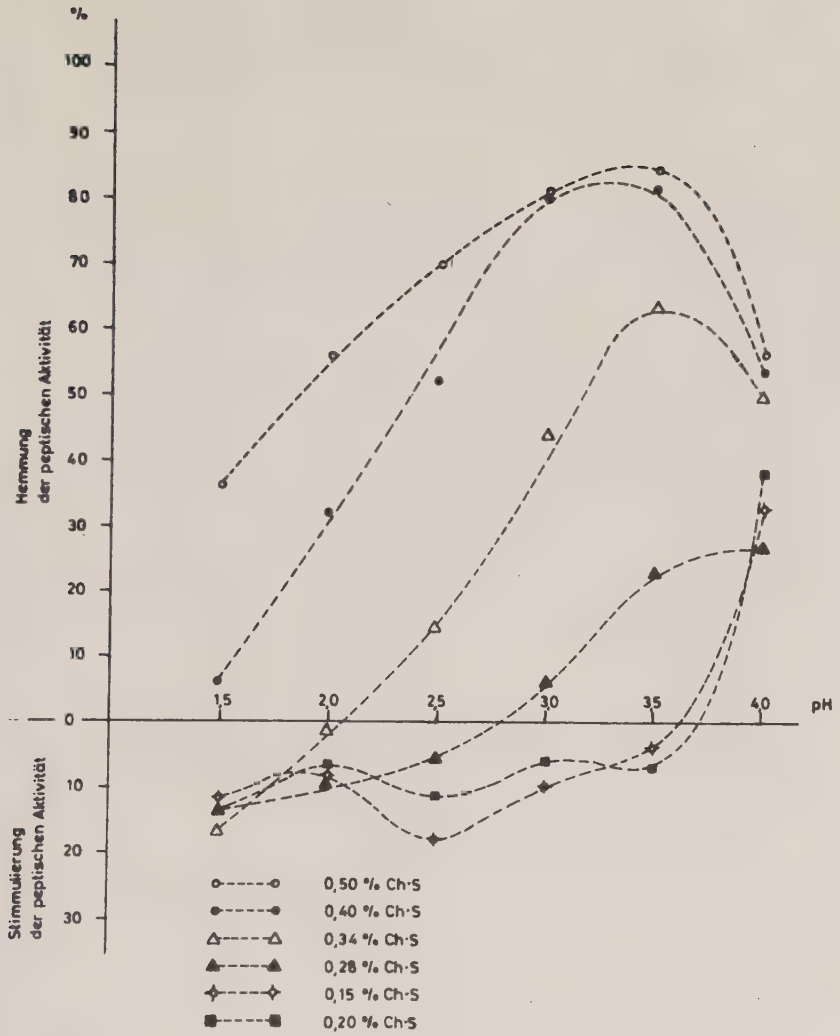


Abb. 13 Hemmung bzw. Stimulierung der peptischen Aktivität vom Magensaft durch unterschiedliche Chondroitinsulfat-Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH.

Versuchsbedingungen: siehe Kapitel über Methodik

9.3. Untersuchung über die Wirkung von Chondroitinsulfat auf die peptische Aktivität bei unterschiedlichen Krankheitsbildern (Tab.2/Abb.14)

Der Versuch wurde mit gleichen Chondroitinsulfat-Konzentrationen (0,34 % Ch·S) durchgeführt. Jedoch wurden die zu untersuchenden Magensäfte nach den Erkrankungen der Patienten eingeteilt. An den gemessenen Daten ist folgendes bemerkenswert:

1. Magensaft von Ulcus-ventriculi-Patienten wird über den gesamten pH-Bereich von pH 1 bis 4 jeweils um >10 % weniger gehemmt als der Magensaft von Ulcus-duodeni-Patienten.

2. Der Magensaft von Ulcus-duodeni-Patienten wird ähnlich stark gehemmt wie der von allen übrigen Patienten (Magensaft von Carcinom-, selektiv vagotomierten Patienten und Normalpersonen). D. h. der Magensaft von Ulcus-duodeni-Patienten verhält sich hinsichtlich der Hemmung der peptischen Aktivität durch Chondroitinsulfat "normal", während der Magensaft von Ulcus-ventriculi-Patienten hiervon deutlich abweicht.

	pH 1,5		pH 2		pH 2,5		pH 3		pH 3,5		pH 4	
Ulcus duodeni	98,9	±13,4	78,7	±11,2	56,5	±11,5	28,4	± 9,7	30,2	±3,8	50,6	±14,2
Ulcus ventriculi	113,3	±16,8	95,0	±18,8	70,0	±14,5	42,0	±17,5	27,7	±6,9	65,1	±23,9
Carcinom	54,6	±0,07	82,3	± 7,6	57,7	± 6,0	30,9	± 8,6	19,8	±3,3	43,1	±12,1
Sel.Vag.u.Pyl.	97,3	±16,8	79,7	±18,1	56,7	±16,2	23,2	± 8,1	22,1	±4,1	46,5	±18,0
Normalpersonen	99,5	±18,4	80,7	±17,1	56,6	±18,6	33,9	±13,3	24,2	±7,9	53,4	±14,6

Tab. 2

Prozentuale Mittelwerte mit Standardabweichungen der proteolytischen Aktivität von menschlichen Magensäften, eingeteilt nach Krankheitsbildern mit Normalpersonen bei Zusatz von 0,4 %iger Chondroitinsulfatkonzentration in Abhängigkeit vom pH.

Versuchsbedingungen siehe Kapitel über Methodik.

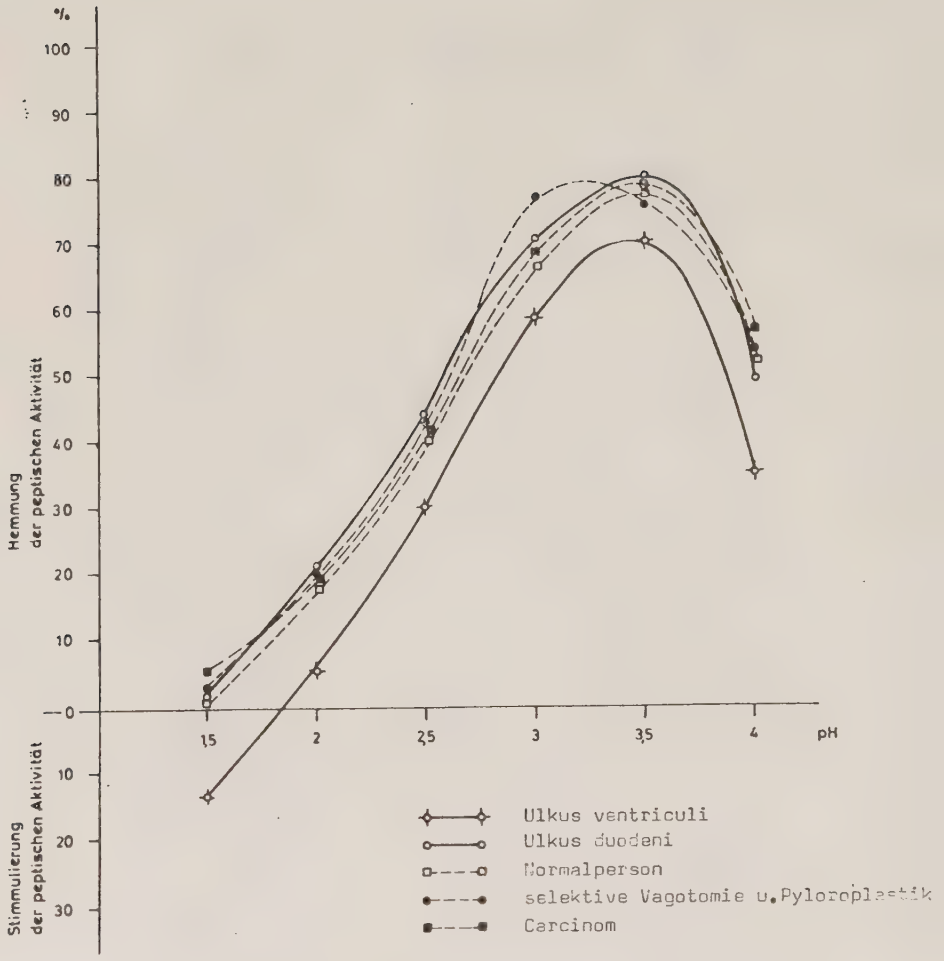


Abb. 14 Hemmung bzw. Stimulierung der peptischen Aktivität menschlichen Magensaftes von Ulcus-duodeni-Patienten und Ulcus-ventriculi-Patienten und Normalpersonen durch 0,4 %ige Chondroitinsulfat-Konzentration in Abhängigkeit vom pH (Versuch 2)

Versuchsbedingungen: siehe Kapitel über Methodik

10. DISKUSSION

10.1. Schwierigkeiten bei der quant. Bestimmung peptischer Aktivität

Jeder der bisher verwendeten Bestimmungsmethoden umfaßt eine andere Wirkung des Enzyms auf das Substrat, so daß man aus dem Aussehen der pH-Aktivitätskurven, wie oben erwähnt, nicht auf das Vorhandensein von bestimmten Enzymen schließen kann. Die Messung von Pepsin ist mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden. So werden zum Beispiel andere proteolytische Enzyme bei niedrigen pH-Werten mitgemessen, dann existiert keine akzeptable Bezugsgröße, und die Proteinsubstrate variieren in ihrer Zusammensetzung. Es mußten also, um eine exakte Bestimmung der peptischen Aktivität zu liefern, folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. Herkunft des Pepsins
2. Art und Konzentration des Substrates
3. Salzkonzentration der Lösung
4. Art des Hemmstoffes und dessen Einfluß auf die Pepsinbestimmung
5. Meßmethodik: a) Extinktionsmessung
   b) TCA-Einfluß
   c) Temperatur-Einfluß
   d) Linearität der Umsetz-Geschwindigkeit

10.1.1. Herkunft des Pepsins

Das zu bestimmende Pepsin war in nativem menschlichem Magensaft von nüchternen Patienten oder gesunden Probanden enthalten. Lediglich grobe Verunreinigungen wurden durch Papierfilter abgetrennt.

10.1.2. Art und Konzentration des Substrates

10.1.2.1. Art des Substrates

Hämoglobin wurde verwandt, weil es leicht in größeren Mengen präpariert werden kann, weil es außerdem für längere Zeit ohne Veränderung in Lösung gehalten werden kann, weil es rasch verdaut wird, und weil das Ausmaß, in dem es verdaut wird, sich nicht von einer Hb-Präparation zur anderen verändert. Das berichten auch schon ANSON und MIRSKY 1932. Diese Qualitäten werden von keinem anderen Protein-Substrat, das zur Bestimmung der peptischen Aktivität verwandt wurde, erreicht. Andere Proteine sind mit jeder Präparation unterschiedlich zusammengesetzt (NORTHROP 1932).

CHIANG, STUART, WOLF und TANG haben 1966 die Aktivität von Pepsin und Gastricsin, die aus menschlichen Magensäften gewonnen waren, mit unterschiedlichen Methoden

gemessen. Mit Hämoglobin als Substrat war die Aktivität von Gastricsin annähernd doppelt so groß wie die von Pepsin. Umgekehrt verhielt sich die relative Aktivität von Gastricsin bei Verwendung von Eieralbumin als Substrat. Zur Unterscheidung der Aktivität dieser zwei Enzyme sollte künftig APDT als Substrat verwendet werden, seit bekannt ist, daß APDT nur Pepsin spezifisch spaltet. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die gesamte proteolytische Aktivität des Magensaftes gemessen.

10.1.2.2. Konzentration des Substrates

SCHLAMOWITZ und PETERSON (1961) sowie SEIJFFERS, MILLER und SEGAL (1964) konnten anhand von Rinderserumalbumin nachweisen, daß die Form der pH-Aktivitätskurve direkt von der Substratkonzentration abhängig ist. Es war also notwendig, die optimale Substratkonzentration zu finden. SCHULT et al. (1974) hatten anhand ihrer Untersuchungen gefunden, daß die optimale Substratkonzentration bei 0,66 % liegt. Bei höheren Konzentrationen, wie sie seinerzeit von ANSON und MIRSKY benutzt wurden, ist das Substratoptimum bereits überschritten (s. Abb. 15). Wir haben in der vorliegenden Arbeit die Konzentration des Substrates so gewählt, daß eine Endkonzentration im Ansatz von 0,66 % für das Hämoglobin erreicht wurde.

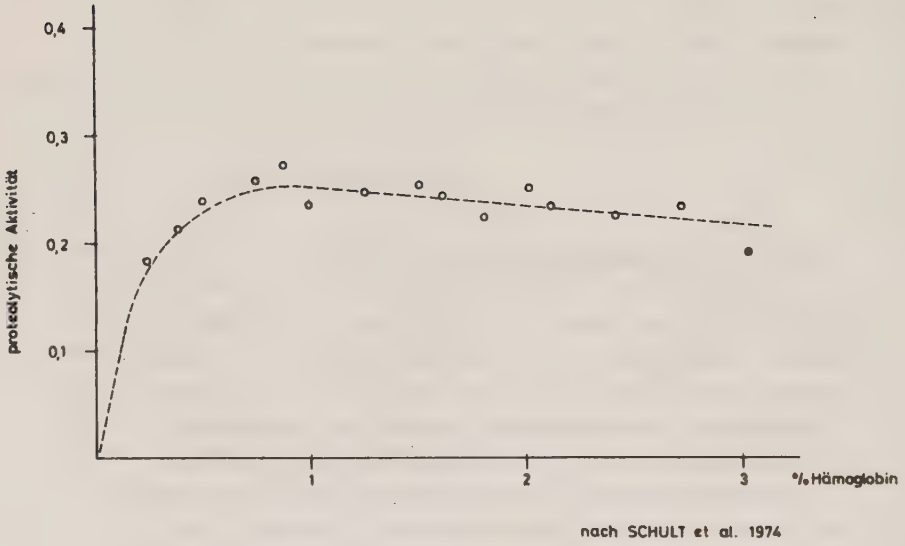


Abb. 15 Einfluß der Substratkonzentration (Rinder-Hämoglobin) auf die proteolytische Aktivität von menschlichem Magensaft (pH 2,5)
(nach SCHULT et al., persönliche Mitteilung 1974)

10.1.3. Salzkonzentration der Lösung

Hohe Salzkonzentrationen vermögen die pH-Aktivitätskurven des Pepsins zu verändern, wie oben beschrieben wurde (SCHLAMOWITZ und PETERSON 1961, BUCHS 1970). Nach Untersuchungen von SCHULT et al. (1974) hat jedoch NaCl im Konzentrationsbereich bis 0,9 % keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivität des Pepsins. Bei höheren Konzentrationen dagegen trat eine beachtliche Erniedrigung der peptischen Aktivität ein (s. Abb. 16).

10.1.4. Art des Hemmstoffes und dessen Einfluß auf die Bestimmung der peptischen Aktivität

In unseren Untersuchungen wurde Chondroitinsulfat der Firmen FLUKA und SERVA verwendet. Das Chondroitinsulfat war aus Rindertrachea gewonnen worden.

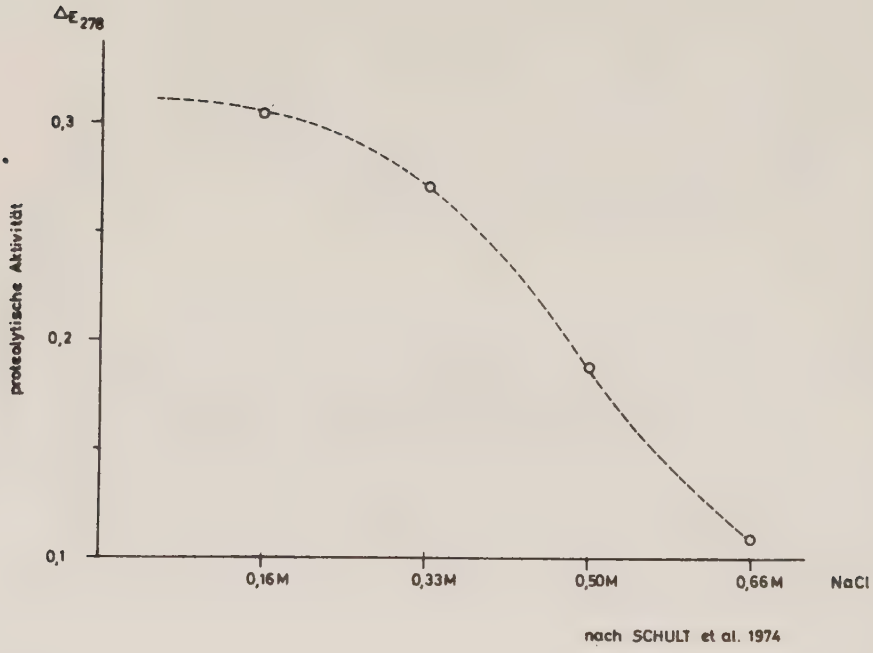


Abb. 16 Einfluß der NaCl-Konzentration auf die proteolytische Aktivität von menschlichem Magensaft
(nach SCHULT et al., persönliche Mitteilung 1974)

10.1.5. Meßmethodik

10.1.5.1. Extinktionsmessung

In der Originalmethode von ANSON und MIRSKY (1932) wurde die peptische Aktivität durch Anfärbung der Spaltprodukte mit Folinragenz bestimmt. BEAZELL et al. beschrieben wenig später eine ähnliche Methode mit Phenolreagenz. WALLENFELS hat 1950 der Messung der proteolytischen Aktivität nach ANSON eine kritische Studie gewidmet und gezeigt, daß bei ihr die Farbstoffbildung sowohl von der Art der Bindung des Tyrosins in den trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukten wie auch von der aktuellen Reaktion abhängt.

In unserem Versuchsaufbau erfolgte die Messung des Zuwachses an Spaltprodukten wegen dieser Schwierigkeiten durch Bestimmung der Absorbtion der aus Hämoglobin freigesetzten tyrosin-ähnlichen Gruppen bei 280 nm mit Hilfe eines Photometers.

10.1.5.2. TCA-Einfluß

In den Versuchen wurde Trichloressigsäure TCA als Fällungsmittel benutzt. Hierbei fällt nicht nur das unverdaute Eiweiß aus, sondern auch höhermolekulare fermentativ abgespaltene Bruchstücke, und zwar am

isoelektrischen Punkt mehr als zu beiden Seiten desselben. Diese ungleichmäßige Ausfällung nach Beendigung der Verdauung kann im Bereich der isoelektrischen Punktes eine intensivere Proteolyse und zu beiden Seiten des isoelektrischen Punktes eine schwächere Proteolyse vortäuschen (CHRISTENSEN 1955).

10.1.5.3. Temperatureinfluß

Als Standardtemperatur haben wir 25 °C verwandt, da bei 25 °C die Inaktivierung von Enzymen durch Denaturierung geringer ist, als bei der sonst oft verwendeten Körpertemperatur von 37 °C. Das entscheidende Argument für 25 °C aber war das geringe Temperaturgefälle zwischen Küvettenhalter und Küvetteninhalt (RICK, FRITSCH, SZASZ 1972).

10.1.5.4. Linearität der Umsetzgeschwindigkeit

Um die Wirkung der Peptidasen auszuschalten, behilft man sich mit einer möglichst kurzfristigen Inkubation der Ansätze. Nach Meinung von BUCHS (1970) ist es daher nur unter Vorbehalten statthaft, die Freilegung des Tyrosins als Maß für die Gesamtproteolyse anzusehen. SCHULT und RÜCK haben Untersuchungen über

die Kinetik des Reaktionsprozesses angestellt und gefunden, daß eine Linearität der Umsetzgeschwindigkeit nur in den ersten zehn Minuten nach dem Start der Reaktion gewährleistet ist. Daher wurde in unseren Versuchen die Reaktion nach zehn Minuten gestoppt.

Als Resümee läßt sich festhalten, daß die Untersuchungen mit einer einfachen, leicht durchzuführenden Methode durchgeführt wurden, bei der versucht wurde, durch Ausschaltung der meisten Störfaktoren optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen, um damit ein relativ genaues Bild über die peptische Aktivität des Magensaftes zu geben.

10.2. Form der Pepsinaktivitätskurve in Abhängigkeit vom pH

Nachdem der Versuchsablauf unter optimalen Bedingungen vonstatten ging, war die Form der peptischen pH-Aktivitätskurve interessant. Wir fanden jeweils eine eingipflige Kurve mit Maximum zwischen pH 2 und pH 2,5. Die Veränderung der Pepsinkonzentration in Form einer Erhöhung der Magensaftzugabe hatte zwar einen Einfluß auf die absoluten Extinktionswerte. Die Form der Kurven blieb jedoch konstant. Ebenfalls war die Aktivitätskurvenform sehr gut bei allen Magensäften, unabhängig von der Grundkrankheit des Patienten, reproduzierbar. Lediglich die Höhe der Aktivität variierte. Das läßt diese Methode der Bestimmung der peptischen Aktivität des Magensaftes für Routineuntersuchungen geeignet erscheinen.

Die gemessene "reine" Pepsinaktivität in Abhängigkeit vom pH ließ sich nun sehr gut als Bezugsgröße für die verringerte bzw. erhöhte peptische Aktivität nach Zugabe von Chondroitinsulfat verwenden.

10.3. Einfluß des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität

In diesem Versuch wurde in vitro der Einfluß des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Daß Chondroitinsulfat als sulfatiertes Mucopolysaccharid eine Hemmwirkung auf die peptische Aktivität ausübt, war schon seit BABKIN und KOMAROV (1932) bekannt. In der Literatur zu diesem Thema war jedoch der Einfluß des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität in Abhängigkeit vom pH wenig beschrieben worden.

Das Maximum der peptischen Aktivität des menschlichen Magensaftes lag in unseren Versuchen jeweils konstant zwischen pH 2 und pH 2,5. Dann erfolgte ein rascher Abfall der Pepsinaktivität bei höherem pH. Die maximale Hemmwirkung des Chondroitinsulfates (0,4 %, 0,5 %) wurde jedoch erst zwischen pH 2,5 und pH 3 erreicht. Die Hemmwirkung durch 0,4 %iges Chondroitinsulfat ist bei pH-Werten von 1,5 und 2 relativ gering, ja sie vermag sich bei niedrigeren Konzentrationen sogar in eine Stimulierung des Pepsins umzukehren. Bei 0,5 %igem Chondroitinsulfat ist zwar in diesem pH-Bereich eine größere Hemmwirkung zu erzielen, aber 0,5 %iges Chondroitinsulfat ist kaum noch herzustellen. Das bedeutet: Im sauren Milieu, zum Beispiel zwischen den Mahlzeiten, ist mit 0,4 % Chondroitinsulfat nur eine verhältnismäßig geringe Hemmwirkung des Pepsins zu erreichen.

In diesem Zusammenhang sind die postprandialen Magensaft-pH-Messungen von SCHULT interessant (Abb.17). Diese zeigen, daß bereits 2 Stunden nach einer Mahlzeit im Magen pH-Werte um 1 bis 2 erreicht werden. Dann ist also die puffernde Wirkung der aufgenommenen Speisen bereits fast vollständig abgeklungen. Gerade dann aber, wenn zwischen den Mahlzeiten das Pepsin zwar nicht maximale, aber doch eine große Aktivität besitzt (s. Pepsinaktivitätskurve), kann durch Chondroitinsulfat keine wesentliche Verringerung der Aktivität erzielt werden. Die pH-Pepsin-Aktivitätskurve braucht dabei nicht gesondert berücksichtigt zu werden, da sie ja als Bezugsgröße (%-Angabe) mit in die Hemmkurve des Pepsins durch Chondroitinsulfat eingegangen ist.

Theoretisch sollte eine Anhebung des pH-Magensaftes zwischen den Mahlzeiten auf pH 2,5 bis 3, z. B. durch Antacida, zusammen mit einer ausreichenden Chondroitinsulfatkonzentration eine optimale Hemmwirkung der Pepsinaktivität hervorrufen. Zu beachten ist außerdem jedoch, daß Chondroitinsulfat in geringen Konzentrationen, weniger als 0,34, besonders im stark sauren Milieu nicht eine Hemmwirkung auf die peptische Aktivität ausübt, sondern im Gegenteil eine Aktivitätssteigerung.

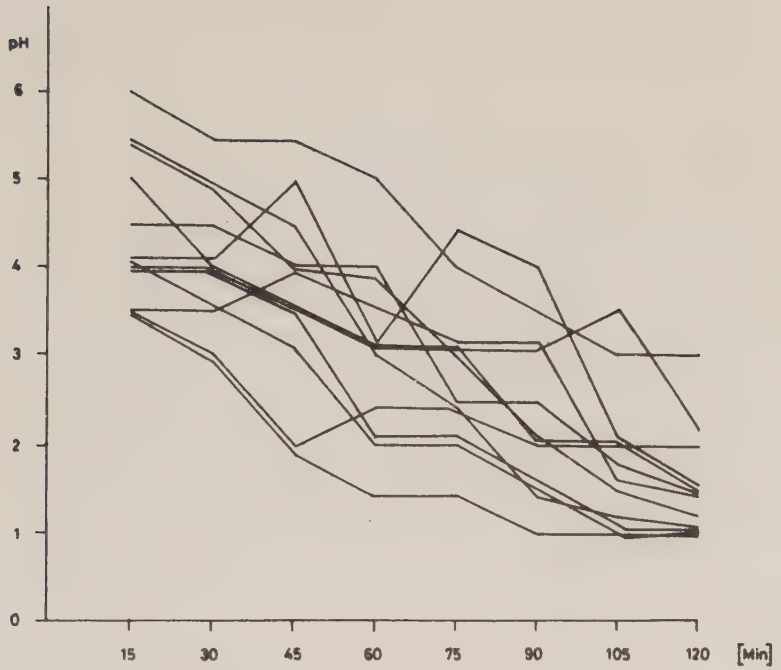


Abb. 17 pH-Werte des Magensaftes von verschiedenen Probanden im Verlaufe von 2 Stunden, gemessen nach einer Mahlzeit (gemischte Kost)
(SCHULT, persönliche Mitteilung)

10.3.1. Stimulierung der peptischen Aktivität

ANDERSON und HOROWITZ beobachteten 1969 bzw. 1970 eine beschleunigte Umwandlung von Pepsinogen zu Pepsin durch Chondroitinsulfat, und zwar bei Konzentrationen, welche niedriger sind als die, die für die Hemmung der peptischen Aktivität benötigt werden. Außerdem fanden sie diese Wirkung nur unterhalb von pH 5. Sie nahmen dabei an, daß eine Interaktion des Chondroitinsulfats mit dem Inhibitor, der bei der Aktivierung des Pepsinogen freigesetzt wird, vonstatten ging. Dieser Inhibitor verbindet sich nämlich zunächst mit dem gebildeten Pepsin zu einem inaktiven Komplex (s. oben). Dies ist nach Meinung von ANDERSON und HOROWITZ der Mechanismus, durch den die sulfatierten Mucosubstanzen die Aktivierung des Pepsinogens zu Pepsin beschleunigen. Das setzt natürlich das Vorhandensein von Pepsinogen voraus.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß die stimulierende Wirkung des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität bei pH 4 nicht vorkommt, während sie bei den niedrigsten Konzentrationen schon ab pH 3,5 auftritt. Bei höheren Konzentrationen verschiebt sich der pH-Wert, ab dem eine stimulierende Wirkung ausgeübt wird, immer mehr in den sauren Bereich. Ab einer Konzentration von 0,4 % Chondroitinsulfat tritt auch schon bei pH 1

eine geringe hemmende Wirkung des Chondroitinsulfates ein. Bei pH 1 liegt die hemmende Wirkung des 0,5 %igen Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität schließlich bei 35 %.

Für die in dieser Arbeit gemessene Aktivitätssteigerung des Pepsins durch Chondroitinsulfat gibt es zwei Entstehungsmöglichkeiten. Einmal könnte durch Chondroitinsulfat direkt die proteolytische Wirkung des Pepsins gesteigert werden. Zum anderen könnte durch Chondroitinsulfat, wie schon von ANDERSON und HOROWITZ berichtet wurde, vermehrt Pepsinogen in Pepsin umgewandelt werden und dadurch eine vermehrte Aktivität hervorgerufen werden. Falls der letztere Mechanismus die Ursache der Aktivitätssteigerung ist, würde das bedeuten, daß noch ein mehr oder weniger großer Pepsinogenanteil in den untersuchten Magensäften vorhanden wäre. Zur Abklärung dieser Dinge bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

Diese "pathogene" Wirkung des Chondroitinsulfates kann von einiger Konsequenz für die Ulcusentstehung im Magen sein, wenn geringe Mengen an Chondroitinsulfat vorhanden sind. Pepsinogen kommt in den Hauptzellen des Magens prinzipiell eingekapselt in Granula vor (ANDERSON). Diese Gebilde werden durch eingedrungene H^+-Ionen lädiert. Das Eindringen der H^+-Ionen kann z. B. durch Gallensalze erleichtert werden. Nun wird das eingekapselte Pepsinogen aus den lädierten Granula freigesetzt. Dieses Pepsinogen

wandelt sich dann unterhalb von pH 5 in Gegenwart von Chondroitinsulfat beschleunigt in Pepsin um. Dadurch kann sich innerhalb der Zelle eine ulcerogene Wirkung des intracellulär gebildeten Pepsins entwickeln. Dieser mögliche Mechanismus der Ulcusentstehung durch Gabe von Chondroitinsulfat ist allerdings nur für den Magen relevant. Denn nur hier ist intracellulär Pepsinogen vorhanden, das zu Pepsin umgewandelt werden kann.

Für die Nebenwirkungen der Pepsininhibitoren (Ulcus disease), die von MARCUS, WATT und PATH (1974) beschrieben wurden, muß man allerdings wohl eine andere Erklärung suchen, denn diese Ulcerationen traten bei verschiedenen Tierspezies im Colon auf.

10.4. Unterschiede des Einflusses von Chondroitinsulfat auf die peptische Aktivität bei Ulcus-duodeni-Patienten und Ulcus-ventriculi-Patienten

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit soll in diesem Abschnitt besprochen werden. Magensäfte von verschiedenen Patienten, die nach Krankheitsbildern eingeteilt worden waren, wurden nach der im Methodik-Teil beschriebenen Art untersucht. Dabei wurde konstant eine 0,4 %ige Chondroitinsulfatlösung als Inhibitor verwandt.

Die bei diesen Versuchen gefundenen Ergebnisse lassen eindeutig erkennen, daß in vitro bei Magensäften von Ulcus-ventriculi-Patienten die Hemmung der peptischen Aktivität bei gleichen pH-Werten wesentlich geringer ist, als bei Ulcus-duodeni-Patienten, aber auch geringer als bei allen übrigen Krankheitstypen, wie auch geringer als bei gesunden Probanden. Der Magensaft von Ulcus-duodeni-Patienten verhält sich anscheinend normal (ähnliche Hemmung wie bei Normalpersonen, Patienten mit Pyloroplastik, selektiver Vagotomie und Carcinom-Patienten). Der Magensaft von Ulcus-ventriculi-Patienten verhält sich dazu deutlich konträr, indem die Hemmung der peptischen Aktivität über den gesamten gemessenen pH-Bereich um mehr als 10 % geringer ist.

Kurz zusammengefaßt: Es besteht in vitro ein signifikanter Unterschied in der Wirkung des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität bei Ulcus-duodeni- und Ulcus-ventriculi-Patienten. Im ersten Teil dieser Arbeit ist ausgeführt, daß der generelle Mechanismus der Inhibierung durch sulfatierte Mucopolysaccharide in einem Inhibitor-Substrat-Komplex besteht. Dieser Vorgang ist bei allen Magensäften konstant. Da die Versuche in vitro gemacht wurden und sämtliche Parameter bis auf die unterschiedlichen Magensäfte konstant gehalten wurden, muß dieses unterschiedliche Verhalten direkt in den Magensäften begründet sein.

Das differente Verhalten von Magensaft von Ulcus-duodeni-Patienten und Ulcus-ventriculi-Patienten

wurde bislang noch nie beschrieben. Bei der weiteren Erforschung dieses interessanten Phänomens kann man der wahren Ursache der Ulcusentstehung in Magen und Darm vielleicht ein Stück näher kommen.

11. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurden Untersuchungen angestellt über die Wirkung von Chondroitinsulfat auf die peptische Aktivität in Abhängigkeit vom pH des umgebenden Milieus. Hierbei wurde die peptische Aktivität mit Hilfe einer einfachen und leicht durchzuführenden Methode bestimmt, die für Routinezwecke geeignet erscheint.

2. Als Bezugswert für die Hemmung der peptischen Aktivität durch Chondroitinsulfat wurde die Pepsin-Aktivitätskurve mitgemessen. Bei dem Versuchsablauf, der unter optimalen Reaktionsbedingungen vonstatten ging, wurde jeweils eine eingipflige Pepsinaktivitätskurve gefunden.

3. Chondroitinsulfat hat in höheren Konzentrationen (0,4 % und 0,5 % Ch·S) über den gesamten gemessenen pH-Bereich (pH 1 - 4) eine hemmende Wirkung auf die peptische Aktivität. Bei niedrigeren Konzentrationen tritt zunächst bei pH 1, dann, wenn die Konzentration noch niedriger wird, auch bei pH 2, 2,5, 3, 3,5 eine stimulierende Wirkung des Chondroitinsulfates auf die Pepsin-Aktivität ein. Bei pH 4 ist bei jeder Konzentration eine Hemmwirkung vorhanden.

4. Chondroitinsulfat erscheint wegen der im sauren Bereich vorhandenen Stimulierung der peptischen

Aktivität bzw. wegen der nur geringen Hemmung (bei 0,4 % Ch·S) bei pH 1 wenig geeignet, den Faktor Pepsin in der Ulcusentstehung im Sinne der Ulcusheilung zu beeinflussen. Denn bereits 2 Std. nach einer Mahlzeit werden im Magen pH-Werte um 1 bis 2 erreicht, die eine Stimulierung der peptischen Aktivität hervorrufen können, wenn nicht eine ausreichend hohe Konzentration an Hemmstoffen (Chondroitinsulfat) vorhanden ist.

5. Es besteht in vitro ein signifikanter Unterschied in der Wirkung des Chondroitinsulfates auf die peptische Aktivität bei Ulcus-duodeni-Patienten und Ulcus-ventriculi-Patienten. Dabei verhält sich der Magensaft von Ulcus-duodeni-Patienten "normal" wie der Magensaft von Patienten mit Carcinom, selekt. Vagotomie und Pyloroplastik und von Normalpersonen. Hingegen ist bei Ulcus-ventriculi-Patienten die Hemmung signifikant über den gesamten gemessenen pH-Bereich (1 - 4) um mehr als 10 % geringer.

Die weitere Erforschung dieses Phänomens kann evtl. die wahre Ursache der Ulcusentstehung in Magen und Darm erklären helfen.

12. Literaturverzeichnis

ABRAHAM, R.; GOLDBERG, L.; COULSTON, F.

Uptake and strage of degraded carrageenan in lysosomes of retieuloendothelial cells of the rhesus monkey, ɱucaca mulatta.

Exp. and Mol. Path. 17, 77 - 93 (1972)

ANDERSON, R.K.; FARMER, C.J.

Studies on eneymatic digestion of gastric mucin.

Proc. Soc. Exp. Diol. Med. 32, 21 (1934

ANDERSON, W.

Inhibitition of peptic activity, protection against histamin ulceration in the guinea-pig, and combination with gastric mucin by an algal polyanion.

J. Pharm. Pharmacol. 11, 318 (1959)

ANDERSON, W.; WATT, J.

The protective action of an algal polyanion against experimentally produced peptic ulceration in the guinea-pig.

J. Physiol. 147, 52 P (1959)

ANDERSON, W.; WATT, J.

The comparative protective effects of degraded carrageenan and aluminium hydoxide on experimentally produced peptic ulceration.

J. Parmacol. Supl. 11, 173 T-175 T (1959)

ANDERSON, W.; WATT, J.

The prevention of histamin induced duodenal ulceration by a sulfated polysaccharide.

Proc. internat. Congr. of Gastry Leyden 391 - 396 (1960)

ANDERSON, W.

The antipeptic activity of sulphated polysaccharides.

J. Pharm. Pharmacol. Supl. 13, 139 (1961)

ANDERSON, W.

The effect of a sulphated polysaccharide upon the diffusion of pepsin through mucin.

J. Pharm. Parmacol. Supl. 13, 122 T - 125 T (1961)

ANDERSON, W.; MARCUS, R.; WATT, J.

The effect of sulfated polysaccharide on the acidity and volume of histamin-stimulated gastric secretion in the guinea-pig.

J. Pharm. Pharmacol. supl. 14, 119 T - 121 T (1962)

ANDERSON, W.; SOMAN, P. D.

Degraded carrageenan and experimental acute gastric ulceration in the guinea-pig.

Nature 4891, 389 (July 27, 1963)

ANDERSON, W.; SOMAN, P.D.

Degraded carrageenan and histamin-induced parietal cell hyperplasia in the guinea-pig.

J. Pharm. Pharmacol 17, 121 - 122 (1965)

ANDERSON, W.; BAILLIE, A.J.

Carrageenans and the proteolytic activity of human gastic secretion.

J. Pharm. Pharmacol. 19, 720 - 728 (1967)

ANDERSON, W.; BAILLIE, A.J.; HARTHILL, J.E.

Peptic inhibitition by macroanions.

J. Pharm. Pharmacol. 20, 715 - 722 (1968)

ANDERSON, W.

Activation of pepsinogen by sulphated glycosamino-glycans a possible role in the peptic ulcerogenesis.

J. Pharm. Pharmacol. 21, 264 - 266 (1969)

ANDERSON, W.

The effect of degraded carrageenan on the reticuloendothelial cells of the rhesus monkey, maccaca mulatta.

Exp. mol. path. 17, 77 - 93 (1972)

ANDRE, C.; HARTHILL, J.E.; LAMBERT, R.; ANDERSON, W.
A study of macroanion inhibitition of peptic activity using a micromethod.
Biol. et Gastro-Enterol. Tome II, 123 - 136 (1971)

ANDRE, C.; DESCOS, F.; ANDRE, F.; LAMBERT, R.
Salvary secretion in subjects with duodenal ulcer.
Digestion 9, 525 - 531 (1973)

ANSON, M.L. ; MIRSKY, A.E.
J. Gen. Physiol. 16, 59 (1932)

ANTONOPULOS, C.A.; CARDELL S.
On the solubility of sulfated galactosaminoglycans (Chondroitinsulfates).
Acta Chem. Scand. 17, 1474 - 1476 (1963)

ARNOTT, St.; GUSS, J.M.; HUKINS, D.W.L.; MATHEWS, M.B.
Mucopolysaccharides comparison of chondroitinsulfate conformations with those of related polyanions.
Science 180, 743 - 745 (1973)

BABKIN, B.P.; KOMAROV, S.A.
The influence of gastric mucus on peptic digestion
Canad. med. Ass. J. 27, 463 - 469 (1932)

BARNES, W.A.; REDO, S.F., ECKER R.R.; WENIG J.
Dextran sulfate - a new and potent antiulcer agent.
Amer. J. Surg. 113, 27 - 31 (1967)

BEAZELL, J.M.; SCHMIDT, C.R.; MONOGHAN, J.F.
A modification of the anson und mirsky hemoglobin method for the determination of pepsin in gastric drainage.
Amer. J. Digest. Diseases 661 - 663

BERARD, A.; MARTIN, R.; LAMBERT, R.
Etude par diffusion sur gélose de linhibitition de la protéolyse peptique par les polysaccharides sulfates.
Gastroenterologia 108, 209 - 218 (1967)

BERGER, A.; NEUMANN, H.; SELA, M.
An assay of pepsin using ribonuclease as substrate.
Short Communications vol 33, 249 - 251 (1959)

BIANCHI, R.G.; COOK, D.L.
Antipeptic and antiulcerogenic properties of a synthetic sulfated polysaccharide (SN-263).
Gastry 47, 409 - 414 (1964)

BLOND, J.; DENIS, J.; Flouvat, B.
Carraghénanas et pouvoir antipeptique.
Ann. pharm. franc. 31, no 3, pp. 189 - 198 (1973)

BLUM, A.L.

Neue Wege in der Ulcusbehandlung.

Schweiz. med. Wschr. 103, Nr. 5, 179 - 187 (1973)

BONFILS, S.; DUBRASQUET, M.; LAMBLING, A.

Modifications secrétoires gastiques après introduction, dans la cavité stomacale, d'un inhibiteur de la proteolyse peptique (Polysaccharide C 16).

Med. exp. 1, 239 - 245 (1959)

BONFILS, S.; LAMBLING, A.

Activité thérapeutique d'un inhibiteur de la proteolyse peptique (Polysaccharide C 16). Etude sur la douleur et l'image radiologique de l'ulcére gastroduodénal.

Thérapie XV, 612 - 622 (1960)

BONFILS, S.; DUBRASQUET, M.; ACCARY, J.-P.

La thérapeutique antipeptique.

Tijdschrift voor Gastro-Enterol. 9, no 1 (1966)

BONFILS, S.

Sulfated polysaccharides as pepsin inhibitors.

Gastroenterology 54, 993 (1968)

BONTOUX, D. (Poitiers)

La protection gastrique par un polysaccharide sulfaté.

La Presse Medicale 79, no 37, 1651 - 1652 (1971)

BRITOV, A.N.; SIDORSKY, A.L.; BOZHKO, N.V.; CHANTURIYA, Zh.A.

Ulcermin- a heparin-like agent in the treatment of peptic ulcer.

BUCHER, G.R.

Uropepsin, a review of the literature and report of some experimental findlings.

Gastry 8, 627-647 (1947)

BUCHS, S.

Die proteolytischen Fermente des Magens.

Ergebnisse der Inn. Med. NF 30, 159 - 233 (1970)

BUDDECKE, E.

Grundriß der Biochemie 188 (1971)

CALCRAFT, B.; RHODES, J.; CROSS, S.; HOLE, D., AUBREY, A.

Strenghthening the gastric mucosa with amylopectin sulphate.

Gut 14 (1973), 825(Abstract)

CAMMARATA, P.S.; BIANCHI, R.G.; FAGO, F.J.
Mechanism of the antipeptic action of amylopectin sulfate (SN-263), an antiulcer, mucin-like agent.
Gastroenterology 61, no 6, 850 - 857 (1971)

CHIANG, L,; CHIANG, Laticia; WOLF, St.; TANG, J.
The seperate measurement of pepsin and gastricsin in human gastric juice.
Gastry 6 Vol. 50 (1966

CHIANG, L.; SANCHEZ-CHIANG, L.; WOLF, S.; TANG, J.
The seperate determination of human pepsin und gastricsin.
Proc. Soc. exp. Biol. 122, 700 - 704 (1966)

CHIANG, L.; SANCHEZ-CHIANG, L.; MILLS, J.; TANG, J.
Purification and properties of porcine gastricsin.
J. Biol. Chem. 242, no 13, 3098 - 3102 (1967)

CAYER, D.; RUFFIN, J.M.
Effect of depepsen in the treatment of peptic ulcer.
Ann. NY Academy of Sciences 140, 744 - 746 (1967)

CHRISTENSEN, L.K.
Concerning the pH-optimum of peptic hydrolysis.
Arch Biochem. 57, 163 - 173 (1955)

COOK, D.L.; EICH, S.; CAMMARATA, P.S.

Comparative pharmacology and chemistry of sythetic sulfated polysaccharides.

Arch. Int. Pharmacodyn. 144, 1-19 (1963)

COOK, D.L.; DRILL, V.A.

Pharmacological properties of pepsin inhibitors.

Ann of NY Acad. of Sciences 140, Art. 2, 724-733 (1967)

DAVENPORT, H.W.

The gastric mucosal barrier.

Digestion 5, 162 (1972)

DEMBINSKY, A.; KONTUREK, S.J.; THOR, P.

The role of vagal innervation in gastric and pancreatic pesponses to meals varying in pH.

J. Physiol. 241, 677 - 688 (1974)

DEMOLE, M.

La prévention de la rechute ulcéreuse est-elle possible.

Schweizerische Med. Wochenschrift Bd. 93,

501 - 504 (1963)

DISCHE, Z.; BORENFREUND, E.

A spectrophotometric method for the microdetermination of hexosamines.

J.B.C. 184, 517 - 522 (1950)

DISCHE, Z.

Fucosa and sialic acid in glycoproteins of the mucus of the digestive tract.

Federation proceedings 19, 904 - 910 (1960)

DIXON, M.

Determination of enzyme inhibitor constants.

Biochem. J. 55, 170 (1953)

DRAGSTEDT, L.R.; LULU, D.J.

Truncal vagotomy and pyloroplasty.

Amer. J. Surg. 128, 344 - 346 (1974)

DUTT, B.; MAGGE, D.F.

Pepsin secretion by Heidenhain pouches in dogs.

Amer. J. Physiol. 223, no 2, 480 - 483 (1972)

EGE, R.

Eine Modifikation des Fuldschen Verfahrens zur Bestimmung von Pepsin.

Z. phys. Chem. 127, 125 - 136 (1923)

EGE, R.; MENCK-THYGESEN P.

Über die Aktivierung des Propepsins.

Biochem. Z. 264, 13 - 23 (1933)

ELLIS, C.M.; LUNSETH, J.B.; NICOLOFF, D.M.
Effect of protease inhibitors on experimental peptic ulceration.
Amer. J. Surg. 119, 213 - 216 (1970)

EVANS, P.R.C.; NOWELL, S.; THOMAS, I.A.P.
Blind trial of a degraded carrageenin and aluminium hydroxyde gel in the treatment of peptic ulceration.
Postgrad. Med. J. 41, 48 - 53 (1965)

FEIFEL, G.; LORENZ, W.; HEIMANN, A.; WÖRSCHING, J.
Bestimmung der basalen und maximal stimulierten Magensaftsekretion
Klin. Wschr. 50, 413 (1972)

FISCHER, A.
Untersuchungen über Muskelkoaguline.
Biochem. Z. 240, 357 (1931)

FISCHER, A.; ASTRUP, T.
Stöchiometrische Bindungsverhältnisse zwischen Heparin und Gerinnungsstoff.
Biochem. Z. 278, 326 (1935)

FRUTON, J.S.; SIMMONS, S.
General Biochemistry.
2nd ed., P 272. Wiley, New York (1958)

GAMBLE, J.R.; WILBUR, J.L.

Chemistry of digestive diseases.

A. Ch. C. Thomas, Springfield (1961)

GAULTIER, M.; LEPERCHEY, F. (Paris)

Intérêt des antipeptiques dans le traitement des diverses gastropathies en pratique courante.

Gazette Médicale de France 71, 755 - 758 (1964)

GERALD, A.; DeGRAFF, J.; LEY, R.; GLASS, G.B.J.

Secretion of a chondroitin sulfate-like substance by the chief cells of the dog gastric mucosa.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 124, 1070 - 1073 (1967)

GLASS, G.B.J.; MORI, H.; PAMER, T.

Measurement of sulfated and non-sulfated glycoproteins in human gastric juice under fasting condition and following stimulation with histamin, pentagastrin and insulin.

Digestion 2, 124 - 143 (1969)

HAENDLE, H.; LORENZ, W.; STURM, H.; WERLE, E.

Über einen pepsinstabilsierenden Faktor (PSF) im Magen und Magensaft bei Mensch und Tier.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 349, 1201 - 1207 (1968)

HÄKKINEN. I.; HARTIALA, K.; TERHO, T.

The fractination and characterisation of the acid polysaccharides of the gastric wall of the dog.

Acta chem. Scand. 19, 800 - 806 (1965)

HÄKKINEN, I.; HARTIALA, K.; TERHO, T.

The fractination and characterisation of the acid polysaccharides in human gastric juice.

Acta chem. Scand. 19, 797 - 799 (1965)

HARIALA, K.; GROSSMAN, M.J.

Studies on chemical and physical changes in duodenal mucus.

J. Biol. Chem. 195, 251 (1952)

HEINEKEN, T.S.

Carrageenan in the management of peptic ulcer.

Amer. J. of gastroenterology 35, 619 - 621 (1961)

HERRIOTT, R.M.; DESREUX, U.; NORTHROP, J.H.

Fractionation of pepsin.

J. gen. Physical 24, 213 - 246 (1941)

HIRSCHMAN, J.L.; HERFINDAL, E.T.

Peptic ulcer disease.

Canad. J. Physiol. Pharmacol. 49, 445 - 451 (1971)

HOROWITZ, M.J.; PAMER, T.; GLASS, G.B.T.

Promotion and activation of pepsinogen by polyanions including RNA and sulfated muco-substances.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 133, 853 - 857 (1970)

HOSKINS, L.C.; ZAMCHECK, N.

Studies on the "mucous barrier" Evaluation of a sialic acid as a protective factor against degradation of gastric mucus by pancreatic endopeptidases.

Gastry 44, 456 - 462 (1963)

HOUCK, J.C.; BHAYANA, Ph.D.J.; LEE, T.

The inhibitition of pepsin and peptic ulcer.

Gastry 39, 196 - 200 (1960)

ISHII, Y.; FURUTA, Y.; TANAKA, T.; MINOWA, M.

Antiprotease activities of amylopectin sulfate (APS).

Folia pharmacol. japon. 70, 507 - 514 (1974)

JANOWITZ, H.D.; HOLLANDER, F.

Viscosity of cell-free canine gastric mucus.

Gastroenterology 26, 582 (1954)

JAQUES, L.F.

The reaction of heparin with proteins and complex base.

Biochem. J. 37, 189 (1943)

JANSSON, M.

Isoelectric spectra of native and base denatured crystallized swine pepsin.

Acta Chem. Scand. 26, 3435 - 3440 (1972)

KARLSON

Lehrbuch der Biochemie (1972)

KOCH, H.; STOLLE, A.; DOMSCHKE, W.; CLASSEN, M.

Einfluß von Heparin auf das Magen- und Duodenal-Sekret.

Z. Gastroent. 10, 163 - 168 (1972)

KUNIMOTO, S.; AOYAGI, T.; NIHIZAWA, R. et al.

Mechanism of inhibitition of pepsin by pepstatin II.

J. Antibiotics 17, no. 6, 413 - 418 (1974)

LAMBERT, R.; ANDRE, C.; BERARD, A.

Origin of the sulfated glycoproteins in human gastric secretion.

Digestion 4, 234 - 249 (1971)

LAMBERT, R.; ANDRE, C.

Sulfated mucosubstances and gastric diseases.

Digestion 5, 116 - 122 (1972)

LANDAZURI, E.; ORTIZ DE; BADELL, M.; CONCHILLO, F.

Tratamiento del ulcus gastroduodenal con polisacáridos sulfatados.

Rev. de Med. E. G. Navarra V: 59, 59 - 73 (1961)

LAURELL, C.B.

Quantitativ estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Analyt. Biochem. 15, 45 - 52 (1966)

LAWRENCE, T.L.J.

The effect of certain dietary factors on in vivo pH changes and pepsin activity in the stomach of a growing pig.

Br. vet. J. 128, 402 - 411 (1972)

LEE, D.; RYLE, A.P.

Pepsinogen D - A fourth proteolytic zymogen from pig gastric mucosa.

Biochem. J. 104, 735 - 741 (1967)

LEVEY, S.; SHEINFELD, S.

The inhibitition of the proteolytic action of pepsin by sulfatecontaining polysaccharides.

Gastry 27, no. 5, 625 - 628 (1954)

LEY, R.; BREMEN, J.; VERBEUSTEL, S.; WOUSSEN-COLLE, M.C. DeGRAEF, J.

Physiology of acid. pepsin, sulfated polysaccharides and glycoproteins by the dog fundic mucosa.

Digestion 2, 113 - 123 (1969)

LITTMAN, A.

Amylopectin sulfate, propantheline and recurrent duodenal ulcer.

Gastroenterology 58, no 6, 913 - 914 (1970)

LITTMAN, A.

Does amylopectin sulfate work in duodenal ulcer or not?

Gastroenterology 62, no 1, 141 - 142 (1972)

LOKEN, M.K.; TERRILL, K.D.; MARVIN, J.F.; MOSSER, D.G.

Comparative studies of three methods for measuring pepsin activity.

J. gen. Physiol. 42, 251 - 258 (1958)

LORENZ, W.; BARTH, H.; KUSCHE, J.; REIMANN, H.J.; SCHMAL, A.; MATEJKA, E.; MATHIAS, Ch.; HUTZEL, M.; WERLE, E.
Histamine in the pig: determination, distribution, release and pharmacological actions.
Europ. J. of Pharm. 14, 155 - 175 (1971)

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.
Protein measurement with the golin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

MARCUS, M.R.; WATT, J.
L'action et la répartition d'un polysaccharide sulfaté au niveau de la muqueuse gastrique.
Arch.des Maladies de l'Appareil Dig. et de la Nutrition 54, 457 - 466 (1965)

MARCUS, R.; WATT, J.
Seaweeds and ulcerative colitis in labaratory animals.
The Lancet 489 - 490, August 30 (1969)

MARCUS, R.; WATT, J.
Ulcerative disease of the solon in labaratory animals induced by pepsin inhibitors.
Gastroent. 67, 473 - 483 (1974)

MARTIN, F.; BERARD, A.; VAGNE, M.; LAMBERT, R.
Etude électrophorétique de l'action de différents polysaccharides sulfatés sur la protéolyse peptique.
C.R. Soc. Biol. 159, 1582 - 1585 (1965)

MARTIN, F.; VUEZ, J.L.; BERARD, A. et al.
A study of the mechanisms of inhibitition of peptic proteolysis by a sulphated polysaccharide.
Digestion 1, 165 - 174 (1968)

MASCH, L.W.; HUCHTING, J.
Über die Auswertung von Pepsinpräparaten und die Einheitlichkeit der Magenprotease.
Hoppe-Seylers Z. Phys. Chem. 301, 49 - 59 (1955)

MATHEWS, M.B.; DECKER, L.
Determination of molecular weight of acid mucopolysaccharides by gel electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 244, 30 - 34 (1971)

MENGUY, R.
Gastric mucus and the gastric mucous barrier.
Amer. J. Surg. 117, 806 - 812 (1969)

MERTEN, R.; RATZNER, H.

Zur Charakterisierung des Magen- und Harnkathepsins des Erwachsenen.

Klin. Wschr. 1949, 587 - 588

MOORE, St.; STEIN, W.

Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids.

J. B. C. 176, 367 - 388 (1948)

MOORE, E.W.; SCARLATA, R.W.

The determination of gastric acidity by the glass electrode.

Gastroenterology 49 no. 2, 178 - 188 (1965)

NORTHROP, J.H.

Cristaline pepsin. Isolation and tests of purity.

J. Gen. Physiol. 13, 739 (1930)

OKABE, S.; NAKAMURA, K.

Effects of antacid, antipeptic and anticholinergic agents on the development and healing of duodenal ulcer in the rat.

Digestion 10, 113 - 121 (1974)

OTENJANN, R.

Neue Aspekte der Pathophysiologie und Therapie der Ulcuskrankheit.

Dtsch. med. Wschr. 99, 1321 - 1324 (1974)

PAMER, T.; GLASS, G.B.J.; HORROWITZ, M.I.

Purification and characterization of sulfated glycoproteins and hyaluronidase-resistent mucopolysaccharides from dog gastric mucosa.

Biochem. 7, no 11, 3821 - 3829 (1968)

PERCIVAL, E.

Chemistry of agaroids, carrageenans, and furcellarans.

J. Sci. Fd Agric. 23, 933 - 940 (1972)

PIPER, D.W.; FENTON, B.

Effect of a sulfated polysaccharide on peptic digestion - A study in vitro of carrageenan (Ebimar)

Gastry 40, 638 - 643 (1961)

PIPER, D.W.; FENTON B.

pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance.

Gut 6, 506 - 508 (1965)

RICK, W.; FRITSCH, W.-P.; SZASZ, G.
Fortschritte der klin. Enzymologie.
Dt. Med. Mschr. 97, 1828 - 1834 (1972)

ROCHA e SILVA, M.; CAVALCANTI, R.Q.; REIS, M.L.
Antiinflammatory action of sulfated polysaccharides.
Biochem. Pharmacol. 18, 1285 - 1295 (1969)

ROCHES, Ph.
Klinische Prüfung eines antipeptischen Medikamentes in der Ulcuskrankheit.
Praxis 42, 1230 - 1232 (1965)

ROSEN, H.; TOWNSEND, P.; SEIFTER, J.
Effect of sodium polyanhydromannuronic acid sulfate on incidence of ulcers in the shay rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 439 - 440 (1956)

ROSEN, H.
A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids.
Arch. Biochem. and Biophys. 67, 10 - 15 (1957)

RUNE, S. J.
pH in the duodenum, its physiological and patho-physiological significance.
Digestion 8, 261 (1973)

SAMLOFF, J.M.

Pepsinogens, pepsins, and pepsin inhubitors.

Gastroenterology 60, 586 - 604 (1971)

SAUTTER, V.; BIRCHER, J.

Das gastroenterologische Krankengut in der Schweiz.

Schweiz. med. Wschr. 102, 738 - 747 (1972)

SCHIFFRIN, M.J.

Production of experimental jejunal ulcer.

Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 45, 592 - 594 (1940)

SCHIFFRIN, M.J.; WARREN, A.A.

Some factors concerned in the production of

experimental ulceration of the G-I tract in cats.

Amer. J. dig. Dis. 9, 205 - 209 (1942)

SCHLAMOWITZ, M.; PETERSON, L.U.

The effect of sodium chloride on peptic digestion of

bovine serium albumin.

Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 46, 381 - 383 (1961)

SCHULT, H.; LORENZ, W.; TROIDL, H.; RHODE, H.; SCHLUCK, M.;

RÜCK, M.

Probleme bei der Bestimmung der proteolytischen

Aktivität des menschlichen Magensaften.

Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 1974

SEIJFFERS, M. J.; SEGAL, H.L.; MILLER, L.L.
Separation of pepsin I, pepsin II A, pepsin II B and pepsin III from human gastric mucosa.
Amer. J. Physiol. 205, 1099 - 1105 (1963)

SEIJFFERS, M. J.; SEGAL H.L.; MILLER, L.L.
Separation of pepsinogen I, pepsinogen II, and pepsinogen III from human gastric mucosa.
Amer. J. Physiol. 205, 1106 - 1112 (1963)

SEIJFFERS, M. J.; MILLER, L.L.; SEGAL H.L.
Effect of concentration of substrate and of chloride on the optimum pH for the proteolysis of bovine serum albumine by human pepsin III.
Biochemistry 3, 5 - 9 (1964)

SIRCUS, W.
Drugs in the treatment of peptic ulcer.
Prescribers' Journal, Vol. 12, No. 1 Feb. 1972

SMYTH, R.D.; BODI, T.; HERCZEG, T.L.; SIPLET, H.
Evaluation of gastric antiprotease-antipepsin activity of carrageenan in humans.
Amer. J. Gastroenterol. 62, 124 - 129 (1974)

SUN, D.C.H.

Effect of a synthetic sulfated polysaccharide (SN-263) on gastric peptic activity in humans.

Ann. NY Academy of Scien. 140, 747 - 753 (1967

SUN, D.C.H.; RYAN, M.L.

A controlled study on the use of propantheline and amylopectinsulfate (SN-263) for recurrences in duodenal ulcer.

Gastroenterology 38, no. 6, 756 - 761 (1970)

TAYLOR, W. H.

Gastric proteolysis in disease.

J. clin. Path. 12, 338 - 343 (1959)

TERHO, T.; HARTIALA, K.

The effect of restraint and some ulcerogenic agents on the sulphation and turnover rates of gastrointestinal polysaccharides.

Scand. J. Gastr. 5, 197 - 205 (1970)

TURNER, M.D.; MILLER, L.L.; SEGAL H.L. TUXILL G.L.

An ultramicro method for the measurement of pepsin.

Anal. Biochem. 16, 487 - 499 (1966)

VAIREL, E.

Inhibiteurs de proteases, utilisation en therapeutique.
Bull. de Chimie therapeutique no 6, p. 481 - 487 (1971)

VOCAC, J.A.; ALPHIN, R.S.

Antiulcerogenic and pepsin inhibitor properties of lignosulfonates.
Arch. int. Pharmacodyn.1, Vol 177 (1969)

WATT, J.; MARCUS, R.

Carrageenan-induced ulceration of the large intestine in the guinea pig.
Gut 12, 164 - 171 (1971)

WALLENFELS, K.

Über die Messung der proteolytischen Aktivität von Enzympräparaten.
Biochem. Z. 321, 418 - 427 (1959

WISE, L.; BALLINGER, W.F.

Effect of vagal stimulation and inhibitition on gastric mucus and sulfated aminopolysaccharide sekretion.
Ann. Surg. 174, 976 - 982 (1971)

WORMLEY, K.G.

A comparison of the response to sekretin, pancreozynin and a combination of these hormones, in men.
Scand. J. Gastroent. 4, 413 - 17 (1969)

ZIMMON, D.S.; MILLER, G.; COX, G.; TESLER, M.A.
Specific inhibitition of gastric pepsin in the treatment of gastric ulcer.
Gastroenterology 1, Vol. 56 (1974)

ZWIERZ, K.; BADURSKI, J.; GINDZIENSKI, A.; KACZMARSKI, M.
Aminosugars in cases of gastric ulcers I. The amount of glucosamine and galactosamine in the human gastric mucosa.
Gastroenterologia 107, 197 - 202 (1967)

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Lorenz, danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung sowie für seine Unterstützung bei der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für experimentelle Chirurgie, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Ganz besonders aber möchte ich mich bei Herrn Dr. Harald Schult für seine umfassende Hilfe, die zahlreichen Anregungen und für den Mut zum Weitermachen, den er mir immer wieder machte, bedanken.

Lebenslauf

20.3.1948	geboren in Baccum / Lingen Eltern: Alois Wesemann und Frau Hedwig
1954	Volksschule in Baccum
1958	Gymnasium Leoninum in Handrup
1966	Abitur
1966 - 1968	Bundeswehr
1968	Studium der Medizin an der Philipps-Universität in Marburg
1973	Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Pathologische Biochemie / Universität Marburg
1974	Staatsexamen
1975 - 1976	Medizinalassistent im Bayerwald Sanatorium in Windischbergerdorf/Cham und in der Chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Siegen
15.4.1976	Approbation
22.10. 76	Eheschließung mit Fräulein Asia Rassech aus Kabul / Afghanistan
1976 - 1977	Assistent in der Neurologischen Abteilung des Psychiatrischen Krankenhauses in Weilmünster / Taunus
ab April 1977	Facharztausbildung in Gynäkologie am Kreiskrankenhaus Leer / Ostfriesland

Meine akademischen Lehrer waren:

die Professoren
H. Amon, H. Arndt, G. Aurich, W. Barthelmai,
J. Berendes, C. Bode, W. Bommer, R. Buchholz,
D. Braesch, A. Castenholz, E. Daume, K. Dehnicke,
K. Dimroth, J. Dittrich, W. Dölle, H. Eißner,
A. Englhardt, G. Exner, H. C. Friederich,
D. Gallwitz, H. Ganz, H. Gerdes, K. Gössel,
K. Golenhofen, E. H. Graul, F. J. Haberich,
H. Hamelmann, H. Hardewig, K. Havemann, I. Hennis,
H. Hensel, H. J. Hering, H. Heuser, G. Hildebrandt,
W. Hort, P. Ihm, H. Jacob, G. Janke, H. Kaffanik,
P. Karlson, G. Keil, D. Klaus, M. Kleinsasser,
H. G. Knauff, H. U. Koecke, W. Koransky,
F. Linneweh, W. Lorenz, W. Mannheim, D. Maroske,
G. A. Martini, S. Massarat, W. Niemeyer, W. Nultsch,
H. Oepen, G. Petri, J. Portig, P. Pots, M. Reim,
F. W. Richter, E. O. Riecken, G. Rodeck,
J. Rohen, E. Schaumlöffel, W. Schiff, F. Schleyer,
W. Schmid, H. Schmidt, P. Schmitz-Moormann,
G. Schneider, W. Seidel, K. Seifart, C. Sekeris,
R. Siegert, C. P. Sodomann, W. Straub, G. Sturm,
H. Stutte, G. Strohmeyer, W. Thoenes, A. Uhlarik,
W. Walcher, W. Wehrmeyer, G. G. Wendt,
A. Wesemann, U. Willenbockel.